Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abteilung E.) Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*. Band 48—51. Herausgegeben von *W. Ruhland, L. Brauner* und *E. Bünning*

Die Zeitschrift „Planta", Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40. — für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Institut der Universität, oder an

Professor Dr. Erwin Bünning, Tübingen, Botanisches Institut der Universität, Wilhelmstraße 5.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301
und
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901

54. Band **Inhaltsverzeichnis** 1. Heft

Seite

JAYASEKERA, R. D. E., and P. R. BELL, The effect of various experimental treatments on the development of the embryo of the fern *Thelypteris palustris*. With 7 Figures in the Text 1

BODE, H. R., Über den Einfluß der Geoinduktion auf die Kationenverteilung im Hypokotyl von *Helianthus annuus*. Mit 1 Textabbildung 15

HEBER, U., Ursachen der Frostresistenz bei Winterweizen. III. Mitteilung. Die Bedeutung von Proteinen für die Frostresistenz. Mit 15 Textabbildungen 34

BAUER, L., und H. MOHR, Der Nachweis des reversiblen Hellrot-Dunkelrot-Reaktionssystems bei Laubmoosen. Mit 3 Textabbildungen 68

HESS, D., Die selektive Blockierung eines an der Blühinduktion beteiligten Ribosenucleinsäure-Eiweißsystems durch 2-Thiouracil. (Untersuchungen an *Streptocarpus wendlandii*.) Mit 9 Textabbildungen 74

SIMONIS, W., und W. FÜCHTBAUER, Beobachtungen zur Photosynthese-Phosphorylierung isolierter Chloroplasten. Mit 4 Textabbildungen 95

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Planta 54, 1—14 (1959)

From the Botany Department, University College, London

THE EFFECT OF VARIOUS EXPERIMENTAL TREATMENTS ON THE DEVELOPMENT OF THE EMBRYO OF THE FERN *THELYPTERIS PALUSTRIS*

By

R. D. E. Jayasekera * and P. R. Bell

With 7 Figures in the Text

(Received July 28, 1959)

Thelypteris palustris is a rhizomatous fern of temperate regions found growing in swampy places in eutrophic conditions. In sunny situations it produces an abundance of fertile fronds. The spores germinate freely and grow readily into cordate gametophytes in pure culture on a mineral agar medium. Vegetative multiplication of cells in the cordate gametophyte is confined to a small area surrounding the lower part of the apical notch. The gametophytes produce first an abundance of antheridia and later archegonia, these appearing in succession just behind the meristematic area at the base of the apical notch. Sporelings can be raised whenever required by placing the archegoniate prothalli in a suspension of antherozoids.

Materials and Methods

To obtain pure cultures of the gametophytes of *Thelypteris palustris* the following procedure was adopted throughout this investigation. A small quantity of spores, sufficient to cover the end of a micro-spatula, was suspended in about 3 ml. of a dilute solution of Manoxol O.T. (a wetting agent) and brought down by centrifuging at 3,000 revolutions per minute. They were then re-suspended and sterilized in a 10% solution of calcium hypochlorite and again brought down by centrifuging, this whole process occupying about five minutes. Finally the spores were re-suspended in a small amount of sterile distilled water. They were then sown by means of fine sterile pipettes on slopes of Moore's medium (1903), solidified with 2% agar.

The cultures were kept at room temperature in diffused daylight supplemented by continuous artificial illumination, giving an intensity during the day of about 60 foot-candles at the surface of the medium. The spores germinated in about seven days. When the gametophytes were about 3 mm. long they were pricked out on to fresh slopes to allow them to grow freely into fully archegoniate and symmetrical cordate gametophytes. Tubes containing these separated gametophytes and experimental material were always placed so that the surface of the medium was more or less horizontal. The original cultures were retained and

* The work described in this paper was carried out by the junior author and formed the subject of a thesis submitted for the M. Sc. degree of the University of London.

served as a source of antherozoids when required. Mature gametophytes suitable for experimentation were ready two to three months after the spores were sown.

The normal course of the embryology of *Thelypteris palustris* was determined from fertilization onwards. The following series of experiments were then carried out to investigate the effects of the gametophyte on the developing zygote.

1. Removal of young embryos. Archegonia containing fertilized eggs were recognizable at from the third to the fifth day following fertilization because of expansion of the tissue at the base of the neck immediately overlying the egg. Using a micromanipulator, minute cuts were made around the embryo so that a portion of the gametophyte containing it, more or less a cube in shape and from 0.1 to 0.2 mm. at each edge, was isolated. This fragment was then transferred to the surface of the normal mineral-agar medium.

2. Insemination of isolated archegonia. Portions of gametophytes bearing about three mature archegonia were excised just behind the base of the apical notch and transferred to a suspension of antherozoids. After 24 hours they were removed and placed upon fresh slopes of the normal mineral-agar medium.

3. Insemina'ion of archegonia in a portion of the gametophyte with the base of the apical notch attached. In this series of experiments the same cuts were made as in the second series, except that no cut transverse to the longitudinal axis of the gametophyte was made on the anterior side of the archegonial cushion. Instead, the longitudinal cuts were continued to the anterior margin of the gametophyte so that the base of the apical notch was included with the extracted fragment. The subsequent treatment was as in the second series of experiments.

4. Replacement of the apical region of gametophytes by a source of indole-3-acetic acid. Eleven intact gametophytes were placed in a suspension of antherozoids and after 24 hours transferred to mineral-agar slopes. Three days later the apical portion was removed from each gametophyte, the transverse cut being made 0.5—1.0 mm. behind the origin of the apical notch. In eight gametophytes a small globule, a little more than sufficient to cover a pin's head, of a cream consisting of equal parts by weight of lanolin and an aqueous solution of indole-3-acetic acid was placed in the centre of the cut surface. In one set of four gametophytes the concentration of indole-3-acetic acid in solution was $1/10^5$ and in the other $1/10^6$. Three prothalli were left untreated.

5. Removal of archegonial necks from above zygotes. As soon as a fertilized archegonium was recognizable by the swelling at the base of the neck, the whole of the neck surmounting this swelling was removed by a transverse cut. The gametophyte was not treated in any other way and was returned to the agar medium.

Orientation of the experimental material on the medium

Preliminary experiments showed that the normal course of embryology was not affected by the orientation of the gametophyte in relation to gravitation. Normally, negative geotropism causes the first leaf and stem apex to turn obliquely upwards from a more or less horizontal origin. If the gametophyte was inverted, the same negative geotropism caused the curvature of these organs to be reversed, but no changes occurred in the nature of the tissues differentiated in the embryo. Consequently in many of the later experiments, the experimental material was placed on the medium with the archegonia uppermost so that developments could be followed without having to disturb the culture. Only in the fifth series of experiments was there any suggestion that the orientation of the experimental material had played any part in the results obtained.

Recording of results

After the various experimental treatments developments were followed under a high-power stereoscopic microscope. Many of the drawings were made from growing material. For anatomical study, specimens were fixed in formalin-propionic-alcohol and subsequently stained in Heidenhain's iron alum haematoxylin.

Results

Normal embryology. On about the fifth day following fertilization the egg cell divided by a wall transverse to the longitudinal axis of the gametophyte. In this and in the subsequent embryology *Thelypteris palustris* resembles other Polypodiaceous ferns (see, for example, WARD, 1954). The first organ to emerge from the ruptured calyptra was the first leaf; the first root emerged at the same time or followed after a very short interval.

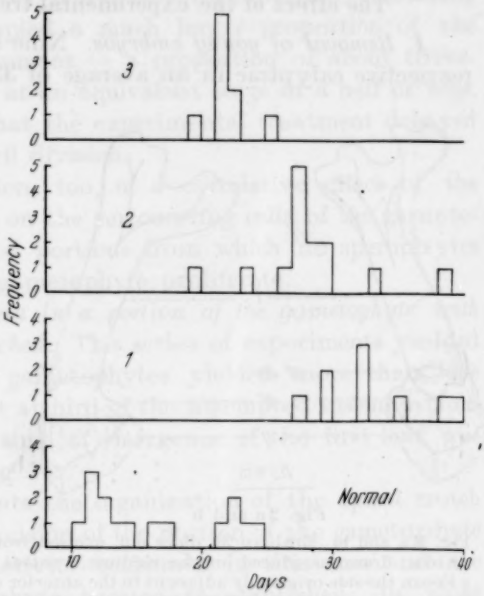


Fig. 1. Frequency histograms to show the relation between the time of emergence of the embryo from the calyptra and the experimental treatment. The numbers adjacent to the three upper histograms indicate the series of experiments to which each refers

Time of emergence of the embryo from the calyptra. The time of emergence was taken as the day on which the embryo ruptured the calyptra. In normal embryology this varied from ten to twenty-five days, with a mean of about twelve days (Fig. 1). The factors influencing this variation were not investigated, but it was noticeable that emergence was slower in winter than in spring and summer. This no doubt reflected the variation in room temperature and illumination with season. In the experimental series, emergence was most delayed where young embryos had been extracted from the gametophytes at the third to fifth day following fertilization. Delay was least where archegonia had been removed with the base of the apical notch intact and inseminated away from the remainder of the gametophyte. Where groups of archegonia alone were removed, and inseminated after removal, the delay was greater than with the base of the notch intact, but less than where removal had been after fertilization. Since each series of experiments continued in parallel over two years, the differences in times of emergence must follow from the operative treatments and not from

seasonal variations. In the fourth series of experiments, since the operative treatment involved the removal of the structure going to form the calyptra, no comparable measure of time of emergence could be made.

The effect of the experimental treatments on embryology

1. Removal of young embryos. Nine sporophytes emerged from their respective calyptrae in an average of 33 days (Fig. 1). The first organ

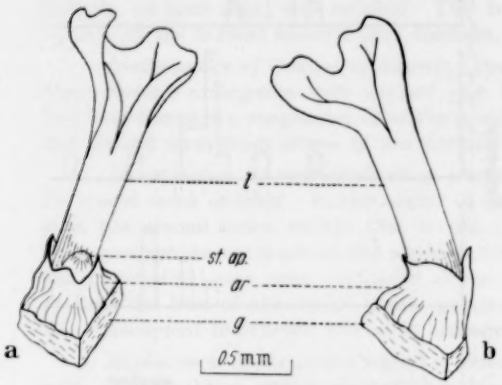


Fig. 2a and b

Fig. 2a and b. Embryo 36 days old, excised from the gametophyte 5 days after fertilization; drawn as placed on the medium, ventral surface of the gametophyte uppermost. a From the side originally adjacent to the anterior of the gametophyte. b From the opposite side. *ar* archegonium; *g* gametophyte; *l* leaf; *st. ap.* stem apex

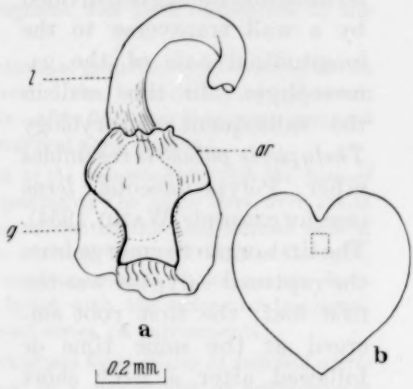


Fig. 3a and b

Fig. 3a and b. a Embryo 27 days old, the archegonium excised from the gametophyte before fertilization. The dotted line indicates the position of the foot and stem apex determined by sectioning. Drawn as placed on the medium, ventral surface of the gametophyte uppermost. *ar* archegonium; *g* gametophyte; *l* leaf. b Diagram showing original position of archegonium; distance between anterior margin of fragment of gametophyte and base of notch, 0.8 mm.

to emerge was, as normally, the first leaf (Fig. 2), but the first root, instead of following closely, did not appear until after about another four days when the first leaf was unfolding and expanding. Sections showed that the isolation of the young embryo did not alter the pattern of development except that the production of the root initial was delayed in relation to the primordia of the other organs. In some of the embryos sectioned it was not possible to detect a root initial even 36 days after fertilization.

2. Insemination of isolated archegonia. In this series of experiments fourteen sporophytes were obtained. No excised portion of gametophyte yielded more than one sporophyte and in about one third of those placed in antherozoids were archegonia successfully inseminated. The first organ to appear was the first leaf, the average time of emergence

being 29 days (Fig. 1). As in the first series of experiments, no root appeared until at least four days later (Fig. 3).

Sections showed that the early embryology of the sporophyte closely resembled the normal, but subsequently, in addition to development being retarded, other differences became apparent. For example, in one specimen sectioned at 27 days, it was seen that the foot, consisting of large vacuolated cells, occupied a much larger proportion of the embryo than in normal development — a proportion of about three-quarters as against the normal at an equivalent stage of a half or less. There is evidence, therefore, that the experimental treatment delayed differentiation in relation to cell division.

There was a clear indication, too, of a correlative effect of the developing zygote and embryo on the surrounding cells of the gametophyte, for only in those excised portions from which no sporophytes appeared did the cells of the gametophyte proliferate.

3. Insemination of archegonia in a portion of the gametophyte with the base of the apical notch attached. This series of experiments yielded nine sporophytes. Again no gametophytes yielded more than one sporophyte and as before about a third of the attempted inseminations were successful. The average time of emergence of the first leaf was 22 days after insemination (Fig. 1).

In eight of these experiments the organization of the apical notch was not broken down by the excision of the portion of the gametophyte containing it. Meristematic activity continued in this area and the cordate form of the gametophyte became re-established. In these experiments it was noteworthy that the embryogeny, although delayed in relation to normal, was closely similar to it, the first root appearing very shortly after the first leaf (Fig. 4). In one experiment, however, although the form of the apical notch was retained, no growth occurred, and it was significant that, not only did this embryo take longer to emerge (26 days as opposed to the mean for this series of 22), but also that the emergence of the root of the embryo was delayed even further (Fig. 5), exactly as in the first series of experiments.

4. Replacement of the apical region of gametophytes by a source of indole-3-acetic acid. Of the four gametophytes with the more concentrated source of indole-3-acetic acid, three produced sporophytes. Although the embryos were morphologically normal, the embryogeny was strikingly different in that the root was the first organ to appear, breaking through the calyptra in 16 to 20 days. The first leaf appeared about one day later. Of the four gametophytes with the weaker source of indole-3-acetic acid, two proved to be fertile. In one the embryo emerged normally 18 days after fertilization, with the leaf preceding the root by about one day; in the other the embryo emerged after 20 days,

with the leaf preceding the root by two days. Of the three untreated gametophytes only one was fertile. The embryo emerged after 20 days, but after a further two days there was still no sign of a root.

5. Removal of archegonial necks from above zygotes. In this series of experiments archegonial necks were successfully removed from above three zygotes in separate gametophytes. The removal was by a clean transverse cut, not damaging the swelling at the base of the neck above the zygote. All the archegonia treated were on the ventral surfaces of the gametophytes. In two experiments the gametophyte was replaced on the medium with the ventral surface downwards, and in the third with the ventral surface upwards. In the first two experiments, the tissue developing from the zygote surprisingly emerged from the upper surface of the gametophyte (Fig. 6). Since this behaviour was never observed as a consequence of any other form of treatment, it was attributed to the disturbance caused by the removal of the neck. In the third experiment, the tissue

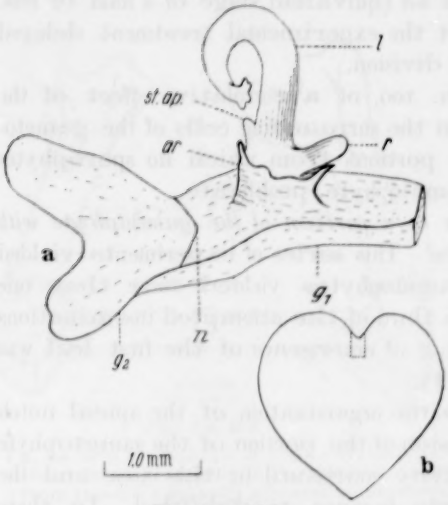


Fig. 4 a and b

Fig. 4 a and b. a Embryo 22 days old, the archegonium excised from the gametophyte before fertilization but with the apical notch attached and active. Drawn as placed on the medium, ventral surface of the gametophyte uppermost. *ar* archegonium; *st. ap.* stem apex; *l* leaf; *r* root; *n* original position of apical notch; g_1 original fragment of gametophyte; g_2 new growth of gametophyte. b Diagram showing position from which fragment of gametophyte was removed

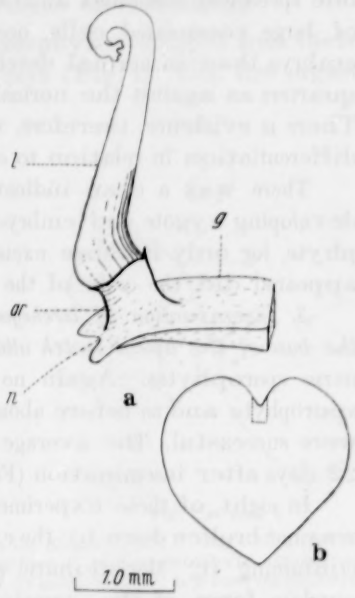


Fig. 5 a and b

Fig. 5 a and b. a Embryo 26 days old, the archegonium excised from the gametophyte before fertilization with the apical notch attached but inactive. Drawn as placed on the medium, ventral surface of the gametophyte uppermost. *ar* archegonium; *g* gametophyte; *l* leaf; *n* apical notch. b Diagram showing position from which fragment of gametophyte was removed

developing from the zygote ascended directly from the uppermost ventral surface (Fig. 7).

The morphological results of these three experiments were closely similar; in all the removal of the neck caused a profound change in the development of the zygote. For example, one of the structures emerging from the upper surface of the gametophyte as a consequence of removing the neck on the fifth day after fertilization consisted of a cylindrical body, 1.0 mm. in diameter and 1.5 mm. in height. On the top of this three growing points developed; the first became evident anteriorly in the median plane on the 35th day, and the other two posteriorly almost simultaneously two days later. Only leaves and stem apices were present for some time, no roots appearing until the 50th day, when one root

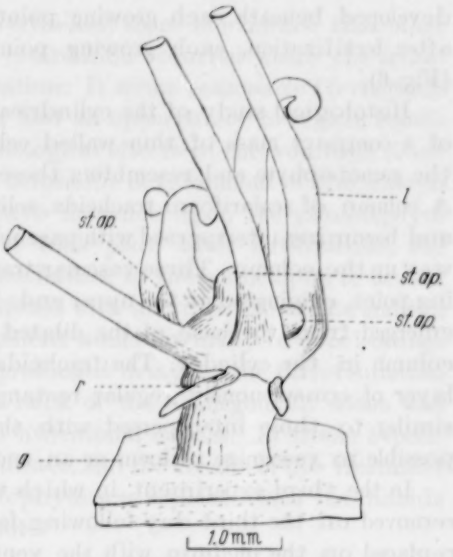


Fig. 6. Cylindrical body developing from zygote 70 days after fertilization following removal of the archegonial neck on the fifth day after fertilization. Drawn as placed on the medium, the dorsal surface of the gametophyte uppermost. *g* gametophyte; *r* root; *l* leaf; *st. ap.* stem apex

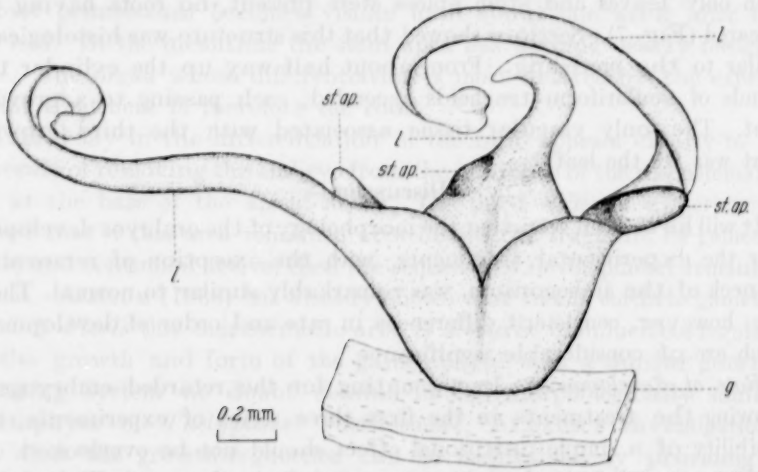


Fig. 7. Cylindrical body developing from zygote 65 days after fertilization following removal of the archegonial neck on the third day after fertilization. Drawn as placed on the medium, the ventral surface of the gametophyte uppermost. *g* gametophyte; *l* leaf; *st. ap.* stem apex

developed beneath each growing point. At the time of fixing, 70 days after fertilization, each growing point had two leaves and one root (Fig. 6).

Histological study of the cylindrical body revealed that it consisted of a compact mass of thin walled cells, little different from those of the gametophyte and resembling those of the foot of a normal embryo. A column of scalariform tracheids, solid below, but broadening distally and becoming interspersed with parenchymatous cells, began about half way up the column. Three vascular traces, one proceeding to each growing point, originated at the upper end. The traces to the first set of roots emerged from the base of the dilated upper portion of the tracheidal column in the cylinder. The tracheidal column was surrounded by a layer of conspicuously regular rectangular cells, parenchymatous and similar to those interspersed with the tracheids above. It was not possible to recognize phloem or an endodermis.

In the third experiment, in which the neck of the archegonium was removed on the third day following fertilization and the gametophyte replaced on the medium with the ventral surface uppermost, the rate of development of the cylindrical body was little different. At the 30th day after fertilization, the body, shallowly trilobed at its distal end, measured approximately 0.75 mm. in diameter and 1.0 mm. in height. At this stage three growing points developed, one on each lobe, but showing no ordered orientation. The first leaf primordia associated with the growing points appeared on the 35th, 41st and 47th days after fertilization. The whole structure was fixed on the 65th day, when only leaves and stem apices were present, no roots having yet appeared (Fig. 7). Sections showed that this structure was histologically similar to the preceding. From about half way up the cylinder two strands of scalariform tracheids ascended, each passing to a growing point. The only vascular tissue associated with the third growing point was in the leaf.

Discussion

It will have been seen that the morphology of the embryos developing after the experimental treatments, with the exception of removal of the neck of the archegonium, was remarkably similar to normal. There were, however, consistent differences in rate and order of development which are of considerable significance.

Rate of development. In accounting for the retarded embryogeny following the treatments in the first three series of experiments, the possibility of a simple nutritional effect should not be overlooked. In all these experiments the pieces removed from the prothalli had few or no rhizoids, and in consequence the absorption of minerals must have been by direct contact with the medium and the supply to the

tissues probably diminished. Nevertheless, there is evidence that other factors were involved. The least retardation occurred where the archegonia were removed before fertilization. It seems reasonable to conclude that the cells of the gametophyte had an opportunity to regain equilibrium and recover from the physiological effects of the wounded tissue bounding the extracted fragment before the development of the embryo began to be rapid and its nutritive demands upon the gametophyte considerable. Where the removal took place after fertilization, the mechanical and physiological disturbances in the gametophyte caused by the wounding would have interfered with the nutrition of the embryo at the very time when its development would normally be accelerating.

It is most unlikely that the prolonged delay in the differentiation of recognizable organs when the neck of the archegonium alone was removed could have been due to nutritional causes. In these experiments the gametophyte remained intact, and the results of the treatment were the same whether the gametophyte was replaced with its rhizoids in contact with the medium or not.

The effects upon embryogeny. In the first and second series of experiments the delay in the differentiation of recognizable organs is both absolute and relative. The production of undifferentiated parenchymatous tissue continues for a longer time and to a greater extent than normally, so that a massive parenchymatous foot is produced before organs become evident. At the same time the normal sequence of development — leaf, root, stem apex — is changed in the experimental material. The first leaf remains the first organ to appear, but no root primordium becomes visible until about one week after the first leaf. In the meantime the stem apex has become clearly recognizable. The organ whose differentiation is most delayed by the experimental treatment is therefore the root.

This delay in the differentiation of the root appears clearly to be the result of removing the embryo from the influence of the meristematic area at the base of the apical notch. The third series of experiments showed that if this area remained attached to the fragment of gametophyte, and continued active, then the sequence of development remained normal. ALBAUM (1938) has already shown that in the cordate gametophyte of *Pteris* this meristematic area is a source of influences regulating the growth and form of the gametophyte, and a similar growth-regulating system no doubt obtains in the morphologically similar gametophyte of *Thelypteris*. Furthermore, ALBAUM'S investigations show that the growth-regulation can be maintained by providing a source of indole-3-acetic acid in place of the apical region, and there is a strong supposition that this auxin is an important component of the natural system. One of the known properties of indole-3-acetic

acid is to promote the development of roots. It seems very likely, therefore, that the retarded differentiation of the roots in the embryos removed from the influence of the meristem of the gametophyte was a consequence of the embryo being deprived of auxin diffusing from it. The results of the fourth series of experiments, although limited by little suitable material remaining at this stage of the investigation and lacking strict controls, nevertheless point strongly to the correctness of this view of the role of auxin in normal embryogeny.

It is interesting to note that in *Polyphlebium venosum* (Hymenophyllaceae), a fern with a filamentous gametophyte, on which the archegonia are borne laterally in groups, the embryo lacks a root until at least two leaves and a filiform rhizome have been produced (STONE, 1958). Although this may be an adaptation related to the hygrophilous habit of this species, it may also be an inevitable morphogenetic consequence both of the absence of well defined sites of meristematic activity in the gametophyte and of the very reduced contact between the embryo and the gametophyte compared with the more usual situation seen in *Thelypteris*.

The general delay in the onset of differentiation in the experimental embryos may also have been partly a consequence of reduced auxin supply. In the fourth series of experiments differentiation of the embryo was slower in the gametophyte not supplied with indole-3-acetic acid than in those supplied. Since in all the gametophytes in this series of experiments the apical portion removed was well before the rhizoid-bearing region of the ventral surface, which consequently remained undamaged, it is unlikely that the differences in the rates of development can be attributed to nutritional effects. *Polyphlebium* again provides an interesting parallel. STONE (1958) remarks that the organs of the embryo become differentiated later than in other ferns; in this respect they resemble, in fact, the embryos of *Thelypteris* deprived of auxin. In *Trichomanes reniforme*, in which the archegonia are borne in groups on the upper and lower sides of narrow, branching, ribbon-like, gametophytes, the undifferentiated foot also occupies a much larger proportion of the young embryo than in *Thelypteris* and ferns with similar cordate gametophytes (HOLLOWAY, 1944).

On the evidence of the experiments described here the hypothesis is advanced that in leptosporangiate ferns with cordate gametophytes auxin diffusing from the apical meristem is responsible for accelerating the differentiation of the embryo in general and of the root in particular. The retarded appearance of the root reported in the embryogeny of certain leptosporangiate ferns with filamentous gametophytes may be a direct consequence of the lower level of auxin available to the embryo, following from the less intense and localized meristematic activity in

the gametophyte and the relative isolation of the embryo. There is the interesting possibility that the remarkable precocity of the development of the root in the embryos of *Ophioglossum* and *Botrychium* grown in natural conditions can be explained by an abundance of indole-3-acetic acid in their gametophytes. These gametophytes are subterranean and mycorrhizal, and indole-3-acetic acid is well known to be a product of fungal metabolism.

Orientation of the first division of the zygote. The first wall dividing the zygote in archegonia inseminated outside the gametophyte was, so far as could be ascertained, orientated in the same plane as normally. This suggests either that a polarity persisted in the egg cell after it had been removed from the gametophyte, or that influences within the archegonium itself brought the first wall into the plane containing the axis of the archegonium. On the whole, evidence is against the latter. In the relatively isolated archegonia of *Polyphlebium* described earlier, the orientation of the first wall of the zygote is variable (STONE, 1958). The same is true of *Cardiomanes* (HOLLOWAY, 1944). It seems reasonable to conclude that the first wall of the zygote tends to form transversely to the longitudinal auxin or other gradients in the gametophyte, and that the effect of these gradients persists after the mature egg cell is removed from them. This polarity is no doubt determined by the orientation of macro-molecules within the cytoplasm and it is not unlikely that this would be retained in mature cells after the orientating influence is removed.

The formative effects of the archegonium. The fifth series of experiments indicates clearly that the upper part of the archegonium itself affects the development of the zygote, quite apart from other influences coming from the gametophyte. There is no reason to suppose that this is brought about by the diffusion of growth-regulating substances from the archegonial neck, since such substances almost always originate from sites of meristematic activity. Meristematic activity does occur in the cells overlying the zygote immediately after fertilization, but this ventral region of the archegonium was not removed in the experimental material. The upper part of the neck consists of cells which rapidly become necrotic as the embryo enlarges, an unlikely source of growth-regulating substances.

The effect of the archegonium upon the zygote may therefore follow directly from mechanical pressure imposed upon the swelling zygote by the archegonium. Removal of the neck clearly releases this pressure, since in the experimental material the canal in the base of the neck gaped widely after the removal of the upper part, and did not collapse as would have been expected in the absence of expansive stresses. The suggestion that the archegonium might control development of the

fern embryo by purely physical means is an old one (see, for example, BOWER, 1935), but until recently (WARD and WETMORE, 1954) has lacked experimental support. A striking feature is that the archegonial apparatus appears to condition the response of the developing zygote to gravity. As a consequence of no experimental treatment other than removal of the archegonial neck has the tissue coming from the zygote grown principally upwards, irrespective of the orientation of the gametophyte. This is despite the fact, shown by sectioning, that the experimental treatment does not destroy intimate cellular contact between the sporophytic and gametophytic tissues. It appears, therefore, that mechanical pressure has a direct effect on the organization of the cells of the embryo, and that the influence of the neck is not one mediated by diffusing substances.

It is of interest to note that in mosses removal of the archegonial neck above the zygote also causes delayed and less sharp differentiation in the ensuing sporophyte (BOPP, 1956). The causal factor again seems to be mechanical pressure (BOPP, 1957).

The way in which mechanical pressure is able to produce these effects is unknown. KNY (1901) reported that he was able to induce and control the direction of division in plant cells by pressure, but his results were not confirmed by HOTTES (1929). Nevertheless, the question is clearly of great importance in causal morphology, since embryos and growing points are subjected to considerable mechanical stresses, and merits further investigation.

Comparison with observations on Phlebodium aureum. WARD and WETMORE (1954) have carried out experiments on *Phlebodium aureum* in which cuts were also made in various positions adjacent to young embryos, without actually removing embryos from the gametophyte. Unfortunately, the results of their experiments are difficult to interpret because, prior to all the various systems of cuts employed, they removed the archegonial neck surmounting the embryo, a treatment which alone, as they first discovered and we have confirmed, produces remarkable effects. In all their experiments the appearance of the root was postponed to a late stage in development. They attributed the depression in the growth rate of partially isolated embryos to an auxin effect, although their experiments did not allow them to distinguish between auxin effects and those arising from wounding and reduced nutrition. We agree in attributing the effect of removing the neck of the archegonium alone to the release of physical restraints normally placed upon the swelling embryo by the archegonial apparatus.

Conclusion

It is concluded from the experiments reported here, and from the earlier work of WARD and WETMORE (1954), that in ferns with cordate

gametophytes the developing zygote is subjected to influences of two kinds.

Firstly, a stream of auxin from the apical meristem of the gametophyte, probably responsible for determining the orientation of the first wall partitioning the zygote, also promotes differentiation in general within the embryo and of the first root in particular.

Secondly, the zygote is subjected to physical pressure within the archegonial chamber. The effect of this pressure is also to promote differentiation, and to prevent extensive and independent undifferentiated growth of the sporophytic tissue. There is evidence that in the absence of this archegonial restraint the sporophytic tissue grows in an upward direction, even bursting through the dorsal surface of the gametophyte. WARD and WETMORE (1954) record a similar result. This suggests that in the normal system the influence of the archegonium on the sporophytic tissue predominates over that of the gravitational field. In *Ceratopteris* HEINRICHER (1888) showed that in embryos formed simultaneously in archegonia on the ventral and dorsal sides of the gametophyte, the meristems of the leaf and root were always formed adjacent to the neck. This would probably hold for other ferns with cordate gametophytes, and is further evidence of the predominance of the influence of the archegonium over that of gravitation.

The results presented in this paper are also relevant to the problem of the factors causing the morphological alternation in the life-cycle of the ferns. The fact that embryos developing in archegonia removed from the gametophyte, surrounded by only a minute amount of gametophytic tissue, generate a normal sporophytic morphology is evidence against LANG's hypothesis that the complex morphology of the sporophyte is attributable to the zygote beginning its life embedded in the gametophyte (LANG, 1909). This aspect of the present work is discussed elsewhere (BELL, 1959).

Summary

1. A technique is described for obtaining symmetrically cordate gametophytes of the fern *Thelypteris palustris* in pure culture.

2. Following controlled fertilization, the normal embryology of *Thelypteris palustris* was followed and found to resemble that of other Polypodiaceous ferns.

3. To investigate the factors controlling the development of the embryo the following experimental treatments were carried out:

a) Removal of very young embryos and their culture independently of the gametophyte.

b) Insemination of isolated archegonia and the subsequent culture of the zygote *in vitro*.

c) Insemination of archegonia in a portion of the gametophyte with the base of the apical notch intact.

d) Replacement of the apical region of gametophytes by a source of indole-3-acetic acid following insemination of the archegonia.

e) Removal of archegonial necks from above zygotes.

4. Whatever the experimental treatment, the tissue developing from a zygote always attained eventually the morphology characteristic of the sporophyte.

5. It is concluded that auxin diffusing from the apical meristem of the gametophyte promotes differentiation in general in the embryo and the development of the first root in particular.

6. There is evidence that mechanical restraint imposed upon the developing embryo by the intact archegonium also promotes differentiation in general, and in addition determines the orientation of the embryo in relation to the surface of the gametophyte.

References

Albaum, H. G.: Inhibitions due to growth hormones in fern prothallia and sporophytes. Amer. J. Bot. **25**, 124—133 (1938). — Bell, P. R.: The experimental investigation of the Pteridophyte life cycle. J. Linn. Soc. Bot. **56**, 188—203 (1959). — Bopp, M.: Die Bedeutung der Kalyptra für die Entwicklung der Laubmoossporogone. Ber. dtsch. bot. Ges. **69**, 455—468 (1956). — Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an Moosmutanten. I. Zur Wirkung der Laubmooskalyptra. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **88**, 600—607 (1957). — Bower, F. O.: Primitive land plants. London 1935. — Heinricher, E.: Beeinflußt das Licht die Organanlage am Farnembryo? Mitt. bot. Inst. Graz H. 2, 239—253 (1888). — Holloway, J. E.: The gametophyte, embryo and developing sporophyte of *Cardiomanes reniforme* (Forst.) Presl. Trans. R. Soc. N. Z. **74**, 196—206 (1944). — Hottes, C. F.: Studies in experimental cytology. Plant Physiol. **4**, 1—29 (1929). — Kny, L.: Über den Einfluß von Zug und Druck auf die Richtung der Scheidewände in sich teilenden Pflanzenzellen. Jb. wiss. Bot. **37**, 55—98 (1901). — Lang, W. H.: In: Discussion on "Alternation of Generations" at the Linnean Society. New Phytologist. **8**, 104—116 (1909). — Moore, G. T.: Methods of growing pure cultures of Algae. J. appl. Micr. **6**, 2309—2314 (1903). — Stone, I. G.: The gametophyte and embryo of *Polyphlebium venosum* (R. Br.) Copeland (Hymenophyllaceae). Aust. J. Bot. **6**, 183—203 (1958). — Ward, M.: The development of the embryo of *Phlebodium aureum* J. Sm. Phytomorphology **4**, 1—17 (1954). — Ward, M., and R. H. Wetmore: Experimental control of development in the embryo of the fern, *Phlebodium aureum*. Amer. J. Bot. **41**, 428—434 (1954).

Dr. P. R. Bell,
Botany Department, University College, Gower Street, London WC 1 (England)

Planta 54, 15—33 (1959)

Aus der Lehr- und Forschungsanstalt für Wein-, Obst- und Gartenbau
Geisenheim a. Rh.

ÜBER DEN EINFLUSS DER GEOINDUKTION AUF DIE KATIONENVERTEILUNG IM HYPOKOTYL VON *HELIANTHUS ANNUUS*

Von

HANS ROBERT BODE

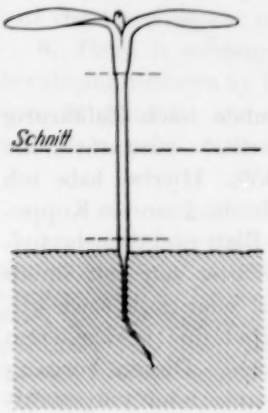
Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 2. Juli 1959)

Wir konnten an alternden Blättern der Tomate nach Zuführung einer synthetischen IES-Lösung über die Blattoberfläche eine erhebliche Einwanderung von *Kalium* feststellen (BODE 1959). Hierbei habe ich die Frage aufgeworfen, ob wir es bei der dort zu beobachtenden Koppelung zwischen Wuchsstoffzuführung im alternden Blatt und dem daraufhin einsetzenden Zustrom von Kalium in die Blätter nur mit einem durch den Ernährungsgrad bedingten Sonderfall oder mit einer allgemeingültigen Beziehung zwischen Aktivitätsgrad der vorhandenen Wuchsstoffmenge und Kaliummenge zu tun haben. Diesen Vorgang haben wir uns über einen *Acceptormechanismus* ablaufend vorgestellt. Ist unsere Vorstellung von einer Koppelung zwischen der durch die Wuchsstoffaktivierung freigesetzten Acceptormenge und dem Kaliumeinstrom in das Gewebe richtig, so müßte man auch bei ungleichem Streckungswachstum eines Organs, wie es z. B. bei einer Geoinduktion an einem Hypokotyl von *Helianthus annuus* in Erscheinung tritt, eine ähnliche Situation erwarten können. Ober- und Unterseite eines geïsch induzierten Hypokotyls weisen, wie es durch den *Avena*-Test erwiesen worden ist, einen verschiedenen Grad der Wuchsstoffaktivierung auf (RUGE 1941). Es schien daher wünschenswert, die mengenmäßige Verteilung der Kationen, insbesondere des Kaliums im ungereizten und geotropisch induzierten Hypokotyl miteinander zu vergleichen. — Auf Grund von Leitfähigkeitsmessungen an Preßsäften aus Ober- und Unterseite geïsch induzierter Hypokotyle von *Helianthus annuus* hat METZNER (1934) einen erhöhten Elektrolytgehalt der Oberseite des Hypokotyls bereits festgestellt. In diesem Tatbestand liegt ein gewisser Widerspruch zu der oben erwähnten Arbeitshypothese der Wechselbeziehung zwischen aktiviertem Wuchsstoff, dadurch freigesetzter Acceptormenge, und der daraus schließlich resultierenden Wanderrichtung für die Kaliumionen. Im folgenden wird der Versuch unternommen, den Fragenkomplex einer weiteren Klärung zuzuführen.

Methodisches

Die für die Versuche verwendeten Keimlinge von *Helianthus annuus* wurden in einem Gewächshaus unter natürlichen Lichtverhältnissen in Eternitschalen (30 × 40 cm) bei Durchschnittstemperaturen von 20—24° C in Sand, dem etwas Komposterde beigemischt war, angezogen. Jede Schale enthielt etwa 40 Sonnenblumenkerne, die in 4 parallelen Reihen gesteckt wurden. Von der Einsaat bis zum Versuchsbeginn verstrichen 6—7 Tage. Die Hypokotyle hatten alsdann eine Länge von 3—4 cm. Die Längsspaltung der Hypokotyle erfolgte freihändig mit einer Rasierklinge. Die Schwankungen zwischen den Trockengewichts- und Aschenprozenten der einzelnen Versuchsserien hängen mit witterungsbedingten Unterschieden in der Zellstreckung zusammen. — Die Trocknung der Hypokotylhälften geschah im Trockenschrank bei 85° C, die Veraschung bei 490° C im Muffelofen. Die Bestimmung der Kationen wurde flammenphotometrisch vorgenommen. Die hierbei verwendeten Ausgangslösungen enthielten 25 mg Asche in 100 ml HCl (1,8 n). Die auf diesem Wege ermittelten *Kali*-Werte können als gesichert angesehen werden, während bei den Ca- und Mg-Werten sich ein Anioneneinfluß störend bemerkbar machen kann. Der Ablesungsfehler des Flammenphotometers von einem halben Skalenteilstrich entspricht 0,2 mg K_2O auf 100 mg Asche. Etwa 60 Hypokotyle sind notwendig, um aus ihren Längshälften je 30 mg Asche zu erhalten. Die geotropische Reizlage wurde durch Hochstellen der Anzuchtschalen um 85° erreicht. Die Pflanzen blieben hierbei an ihrem Anzuchtort im schattierten Gewächshaus, so daß Schockwirkungen durch Adaptationen an andere Umweltbedingungen vermieden wurden. Die Versuche wurden meist in die frühen Morgenstunden verlegt, um bei hohem Luftfeuchtigkeitsgehalt und möglichst konstanter Temperatur arbeiten zu können. Kontroll- und Versuchspflanzen waren somit zeitlich gleichen Bedingungen ausgesetzt.



A	B	C
6,01	16,46	46,7
5,23	15,51	44,7

Abb. 1. *A* Trockengewicht in Prozenten des Frischgewichts; *B* Aschengehalt in Prozenten des Trockengewichts; *C* K_2O-Gehalt in Prozenten des Aschengewichts (vgl. Tabelle 1)

Versuche mit längshalbierten Hypokotylen

Die von den Kotyledonen nach der Basis aufeinanderfolgenden Gewebepartien eines jugendlichen Hypokotyls der Sonnenblume befinden sich in verschiedenen Stadien der Zellstreckung. Plasma und Vacuolenanteil differieren in den einzelnen „Querschnittszonen" in dem Sinne, daß daraus ein Anstieg der jeweiligen Trockengewichts- und Aschenprozente von der Basis zu den Kotyledonen hin resultiert. Die für dieses Altersstadium (6—7 Tage) ermittelten Daten veranschaulichen Abb. 1 und Tabelle 1. Der Aschengehalt der durch einen median geführten Längsschnitt hergestellten Hypokotylhälften stellt demnach

Tabelle 1. *Ungereizte Hypokotyle von Helianthus annuus quer halbiert* (Je 4 Versuchsserien)

	1	2	3	4	5	6
	Frischgewicht in g	Trockengewicht in g	Trockengewicht in Prozenten des Frischgewichtes	Aschengehalt in Prozenten des Trockengewichts	Aschengehalt in Prozenten des Frischgewichts	K_2O in 100 mg Asche mg
Basalteil						
Mittelwert . .	3,578.8	0,187.1	5,23	15,51	0,810	44,7
F_m			±0,08	±0,29	±0,021	±0,52
Spitzenteil						
Mittelwert . .	3,328.8	0,199.9	6,01	16,46	0,984	46,7
F_m			±0,13	±0,40	±0,026	±0,50

Tabelle 2. *Längshälften von ungereizten Hypokotylen von Helianthus annuus* (Kontrollpflanzen zu den Versuchsgruppen der Tabelle 3a und b)

1	2	3	4		5	6	
Versuchsgruppe	Frischgewicht linke Hälfte / rechte Hälfte g	Trockengewicht linke Hälfte / rechte Hälfte g	Trockengewicht in Prozenten des Frischgewichtes links	Trockengewicht in Prozenten des Frischgewichtes rechts	Differenz	K_2O in 100 mg Asche in mg links	K_2O in 100 mg Asche in mg rechts
I	2,786 / 2,916	0,135.4 / 0,140.3	4,81	4,85	0,04	45,4	45,5
F_m						±2,09	±2,21
II	1,337 / 1,482	0,067.1 / 0,73.8	5,01	4,98	0,03	46,7	46,5
F_m						±0,2	±0,1
III	1,585.6 / 1,520.9	0,093.4 / 0,088.0	5,88	5,78	0,10	43,7	43,4
F_m						±1,04	±1,12

den Mittelwert dieser unterschiedlichen Verteilung dar. In jeder Versuchsreihe wurden ungereizte und gleichalte geïsch induzierte Hypokotyle der Länge nach halbiert und auf ihren Frisch-, Trocken- und Aschengehalt, sowie auf die in ihnen enthaltenen Kationenanteile hin untersucht. Die auf solche Art gefundenen Werte der Kontrollserien zeichnen sich durch relativ geringe Unterschiede der getrennt veraschten linken und rechten Hypokotylhälften aus. Die Zahlen für die Trockengewichtsprozente beider Hälften differieren nur um 0,05%. Die Differenz der Kaliwerte zwischen rechter und linker Seite liegt fast innerhalb der Fehlergrenze der flammenphotometrischen Bestimmungsmethode (Tabelle 2, Spalte 6).

Schwieriger zu ermitteln sind die Verhältnisse, die in den geïsch gereizten Hypokotylen auftreten. Die mit der Ingangsetzung der

geotropischen Reaktion in der Ober- und Unterseite des Organs entstehenden mechanischen Veränderungen und die beginnende Krümmung des Organs erschweren eine genaue mediane Schnittführung bei der Längshalbierung. Nach der Spaltung erscheint die Oberseite konkav nach außen durchgebogen, während die Aufkrümmung der Unterseite nach der Abtrennung fast verschwindet (plastische Dehnung, STRUGGER 1932). Der in das Rindengewebe der Unterseite erfolgende — wohl auxinbedingte — Wassereinstrom und die dort anzutreffende erhöhte Plasmaquellung führen zu einer leichten Deformierung des Querschnitts nach unten. Daher zeigen die geotropisch gereizten Hypokotyle für Ober- und Unterseite größere Zahlenunterschiede ihrer Frischgewichte auf als die Kontrollen (Tabelle 3a). Die Spanne zwischen ihren Trockengewichtsprozenten ist gegenüber den Kontrollen stark erhöht. Da wir bei den geïsch gereizten Organen gleichzeitig mit einem Wassereinstrom in die Gewebe der Unterseite wie auch mit einer Verlagerung von Trockensubstanz zu rechnen haben, ist die Wahl eines gemeinsamen Bezugssystems erschwert. So weist eine Gegenüberstellung der Prozente des Aschengehaltes je nachdem, ob sie nach dem Frisch- oder dem Trockengewicht berechnet worden ist, verschiedene Tendenzen auf. Die auf das Frischgewicht bezogenen Aschenprozente bestätigen in der Mehrzahl der Fälle die von METZNER[1] (1934) mit Hilfe von Leitfähigkeitsmessungen an Preßsäften beider Hypokotylhälften ermittelte Erhöhung des Elektrolytgehalts der Oberseite. Trotz dieses feststellbaren Übergewichts der Aschenbestandteile in den Geweben der Oberseite weist die flammenphotometrische Analyse der Gesamtasche für den *Kaliumgehalt* bei allen Versuchsserien eine Erhöhung zugunsten der *Unterseite* auf. Die mittlere Differenz beträgt je nach der Länge der Expositionszeiten 1,1—2,6 mg und entspricht damit rund 2—5% der vorhandenen Kaliummenge (Tabelle 3b, Spalte 3 und 7). Die gefundenen Unterschiede zwischen den Kaliwerten beider Hälften sind zwar gering, sie treten jedoch bei jedem Versuchspaar auf und sind methodisch einwandfrei zu fassen. Wir dürfen bei der Beurteilung der Menge auch einen Punkt nicht übersehen, auf den bereits GUNDEL (1933) bei seinen Katalaseuntersuchungen am gleichen Objekt hingewiesen hat, daß nämlich beträchtliche Konzentrationsunterschiede in bestimmten Gewebeschichten lokalisiert aufgetreten sein können, die in unsern

[1] METZNER hat seinen Befund, daß der Elektrolytgehalt der Oberseite eines horizontal gelegten Hypokotyls leicht erhöht ist, an Hypokotylen gewonnen, die während der Versuche in einem Streckbett aus Gips einer Dauerreizung von 6 Std unterworfen waren. Diese Methode bringt es mit sich, daß wesentliche Phasen des natürlichen Ablaufs der geotropischen Reaktion, nämlich die allmähliche Frischgewichtszunahme der Unterseite (Erhöhung der Wasserpermeabilität) behindert werden. Erst beim Herausnehmen aus den Rillen des Gipsblockes vollzieht sich im Zeitrafferstil die Einkrümmung des Organs.

Tabelle 3a. *Längshälften der Hypokotyle von Helianthus annuus nach Einwirkung einer Geoinduktion*

Versuchsgruppe	1 Geoinduktion min	2 Frischgewicht Oberseite/Unterseite g	3 Trockengewicht Oberseite/Unterseite g	4 Trockengewicht in Prozenten des Frischgewichts: Oberseite	4 Unterseite	5 Verhältnis Oberseite: Unterseite	6 Aschengehalt in Prozenten des Trockengewichts	7 Aschengehalt in Prozenten des Frischgewichts
I	120	2,652.4 / 3,284.6	0,135.7 / 0,162.9	5,12	4,95	1,034	12,98	0,666
							12,95	0,645
F_m		—	—	—	—	± 0,001	± 0,56	± 0,034
							± 0,50	± 0,028
II	90	3,207.3 / 3,663.7	0,171.5 / 0,187.2	5,35	5,11	1,046	15,55	0,850
							15,43	0,849
F_m		—	—	—	—	± 0,005	± 0,60	± 0,043
							± 0,42	± 0,058
III	45	3,716.9 / 4,341.3	0,204.4 / 0,239.6	5,50	5,75	0,956	14,39	0,771
							14,36	0,775
F_m		—	—	—	—	± 0,001	± 2,1	± 0,040
							± 1,4	± 0,034

Versuchen bei der summarischen Veraschung der ganzen Hypokotylhälften unvermeidlich nivelliert werden. Versucht man nun die effektiv eingetretene Verschiebung an Kaliumionen zu erfassen, so scheint ein gangbarer Weg die Berechnung der Aschenwerte auf ein mittleres

Tabelle 3b. *Kaliumgehalte in den Längshälften geïsch induzierter Hypokotyle von Helianthus annuus* (Mittelwerte aus insgesamt 8 Versuchsserien)

Versuchsgruppe	1 Reizdauer min.	2 K_2O in 100 mg Asche: Oberseite	2 Unterseite	3 Asche mg[1] Oberseite/Unterseite	4 Verhältnis Oberseite zu Unterseite	5 K_2O-Anteil der Asche mg Unterseite/Oberseite	6 Verhältnis Unterseite zu Oberseite	7 K_2O in 4 g Frischgewicht Unterseite/Oberseite	8 Verhältnis Unterseite zu Oberseite
I	120	46,8	48,5	32,595 / 32,391	1,007	16,077 / 15,617	1,029	12,491 / 12,397	1,007
F_m		—	—	—		—	± 0,004	—	± 0,004
II	90	50,1	52,7	28,088 / 27,878	1,008	14,982 / 14,350	1,044	17,720 / 16,972	1,004
F_m		—	—	—		—	± 0,005	—	± 0,004
III	45	44,6	45,7	30,930 / 31,121	0,994	14,288 / 13,786	1,036	13,790 / 14,966	0,922
F_m		—	—	—		—	± 0,001	—	± 0,001

[1] Auf gleiches Trockengewicht berechnet.

Kaliumverlagerung: Versuchsgruppe I 3,4%; Versuchsgruppe II 5,2%; Versuchsgruppe III 2,2%.

Trockengewicht zu sein (Tabelle 3b, Spalte 4). Dabei bestätigt sich, wohl infolge des Wassereinstroms in die Gewebe der Unterseite, ein geringes Aschendefizit der Unterseite gegenüber der Oberseite. Ungeachtet dieses geringen Absinkens des Gesamtaschengehaltes gegenüber der Oberseite ergibt die Multiplikation der für die Kaliumkonzentration in der Asche gefundenen Zahlenwerte mit den Mengen der Gesamtasche der jeweiligen Hypokotylhälften einen eindeutigen *Überschuß an Kalium zugunsten der Unterseite* (Tabelle 3b, Spalte 7). Die Unterschiede der Überschußwerte für das Kalium erklären sich einerseits aus Witterungsschwankungen bei den einzelnen Versuchsserien, wie auch aus der Einwirkungsdauer der Geoinduktion (Maximum bei 90 min). Wählen wir statt des Trockengewichts das Frischgewicht als Bezugssystem, so entsteht ein abweichendes Zahlenbild für den Kaliumüberschuß der Unterseite (Tabelle 3b, Spalte 7/8). Entsprechend der verschieden starken Frischgewichtszunahme (Wassereinstrom in das Rindengewebe) der Unterseite differieren die erhaltenen Werte je nach Einwirkungsdauer der Geoinduktion. Das Maximum der Werte für den Kaliumüberschuß liegt auch hier bei 90 min und fällt nach 120 min wieder ab. Da die Permeabilitätserhöhung für Wasser der für Kalium anscheinend vorausgeht, finden wir bei einer Geoinduktion von 30—50 min noch Minuswerte gegenüber der Oberseite.

Wie verhält es sich nun mit den Änderungen der Konzentrationen der übrigen Kationen? Außer Kalium wurden Natrium, Calcium und Magnesium bestimmt. Die Asche des Hypokotyls von *Helianthus annuus* ist in diesem Jugendstadium (6—7 Tage alt) derart reich an Kalium, daß die Gesamtmenge der übrigen Kationen sich zu ihm wie 1:5 verhält. Beispiel: Nach einer Geoinduktion von 120 min sind in 100 mg Asche enthalten:

	K_2O	Na_2O	CaO	MgO
Oberseite des Hypokotyls	50,5	1,6	4,9	3,2
Unterseite des Hypokotyls	52,5	1,7	4,1	3,2

Das Natrium verhält sich bei der Geoinduktion des Organs ähnlich wie das Kalium, seine Menge ist aber verschwindend gering. — Das Calcium weist entsprechend dem vorhandenen Kaliumüberschuß nach der Geoinduktion in den Geweben der Unterseite eine Abnahme seiner Konzentration in der Asche auf. Zunahme des einen Elements und Rückgang des anderen entsprechen nicht immer dem Verhältnis 2 K = 1 Ca. Es ist aber auch anzunehmen, daß der Konzentrationsrückgang des Calciums in der Asche der Unterseite (abgesehen von der Verringerung der Gesamtasche) nur durch eine vermehrte Kaliumeinwanderung zustande kommt, ohne daß es zu einem Austausch von Calcium gegen Kaliumionen kommt.

Man könnte einwenden, daß eine Fehlerquelle, die an dem Zustandekommen der unterschiedlichen Kaliwerte zwischen Ober- und Unterseite beteiligt sein kann, in der gewichtsmäßigen Ungleichheit der beiden Hypokotylhälften zu suchen sei. Da aber bei den ungereizten Hypokotylhälften bei gleicher mengenmäßiger Differenz kein mit unserer Methode zu fassender Unterschied im Kaliumgehalt zu ermitteln war, scheidet dieser Einwand wohl aus. — Anders liegen die Verhältnisse bei einer Schrägabweichung des bei der Halbierung geführten Schnittes. Wie wir oben bereits erwähnt haben, fällt die Kaliumkonzentration von den Kotyledonen nach der Basis des Hypokotyls ab. Ist an einer Längshälfte infolge der Schrägabweichung basales Gewebe stärker beteiligt, so ergibt sich für sie ein Absinken der Kaliwerte, beim Überwiegen apikalen Gewebes steigen sie an (vgl. Tabelle 1). Hierbei verschiebt sich auch das Verhältnis des Rindenanteils zu dem des Gefäßbündelringes bzw. des Marks der Querschnittsfläche der beiden Hypokotylhälften. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen stellten sich jedoch die Befürchtungen wegen der oben erwähnten Fehlerquelle als gegenstandslos heraus (vgl. die Veränderungen der Kaliwerte nach der Geoinduktion in longitudinaler Richtung im folgenden Abschnitt).

Versuche mit querhalbierten Hypokotylen

Wir gingen bei den bisher besprochenen Versuchen von der Verteilung der Aschenbestandteile im längshalbierten ungereizten Hypokotyl aus. Es fragt sich aber, ob das dort vorgefundene Verteilungsverhältnis der Aschenbestandteile, insbesondere des Kaliums, auch in der *longitudinalen* Richtung des geïsch gereizten Hypokotyls seine Gültigkeit hat. Es wäre doch durchaus denkbar, daß während des Fortschreitens der geotropischen Reaktion stoffliche Verschiebungen in longitudinaler Richtung im Organ vor sich gehen, die von einer Elektrolytwanderung begleitet sind. Teilen wir ungereizte und geïsch induzierte Hypokotyle von *Helianthus annuus* durch einen Querschnitt in zwei annähernd gleiche Teile, einen basalen und einen apikalen, so stoßen wir bei der Gegenüberstellung der Kaliwerte der Asche beider Zonen wieder auf einen auffallenden Unterschied. Im ungereizten Hypokotyl liegt die Differenz der Kaliumkonzentration zwischen Basis und Spitzenteile stets höher als in den geïsch induzierten Hypokotylen (Tabelle 4, Spalte 7). Im Gefolge dieser Vorgänge tritt notwendigerweise auch eine Verringerung der Trockengewichts- und Aschenprozente zwischen basaler und Spitzenzone des Hypokotyls ein. Die Verringerung erfolgt zunächst durch ein Ansteigen des Kaliumanteils an der Gesamtasche im basalen Teil. Vergleichen wir die im Organ bei verschiedener Einwirkungszeit der Geoinduktion resultierenden Verhältnisse (Tabelle 4 und 5), so finden wir 30—45 min nach Induktionsbeginn einen Anstieg der Kalium-

Tabelle 4. *Veränderungen im Apikal- und Basalteil des Hypokotyls von Helianthus annuus nach erfolgter Geoinduktion*

Reizdauer: 45 min. (Mittelwerte aus 2 Versuchsserien)

1	2	3	4	5	6	7
	Frisch-gewicht in g	Trocken-gewicht in g	Trocken-gewicht in Prozenten des Frisch-gewichtes	Aschengehalt in Prozenten des		mg K_2O in 5 g Frisch-gewicht
				Trocken-gewichts	Frisch-gewichts	
Kontrollen						
Apikalteil .	3,168.0	0,188.2	5,94	17,24	1,013	20,031
Basalteil . .	3,384.0	0,176.7	5,28	15,75	0,824	15,735
Differenz	—	—	0,66	1,49	0,189	4,296
Geïsch induzierte Pflanzen						
Apikalteil .	3,769.7	0,209.3	5,55	18,33	1,018	20,841
Basalteil . .	3,773.4	0,189.6	5,02	17,69	0,888	17,583
Differenz	—	—	0,53	0,64	0,130	3,258

Nach einer Geoinduktion von 45 min Summe der Kaliwerte aus Spalte 7:

Ungereizte Hypokotyle (Kontrollen):	Geïsch gereizte Hypokotyle:
20,031	20,841
15,735	17,583
35,766	38,424
	+ 2,658 mg

Tabelle 5. *Veränderungen im Apikal- und Basalteil des Hypokotyls von Helianthus annuus nach erfolgter Geoinduktion*

Reizdauer: 90 min. (Mittelwerte aus 2 Versuchsserien)

1	2	3	4	5	6	7
	Frisch-gewicht in g	Trocken-gewicht in g	Trocken-gewicht in Prozenten des Frisch-gewichtes	Aschengehalt in Prozenten des		mg K_2O in 5 g Frisch-gewicht
				Trocken-gewichts	Frisch-gewichts	
Kontrollen						
Apikalteil .	5,215.1	0,270.4	5,18	19,61	1,018	22,945
Basalteil . .	5,313.7	0,245.1	4,55	18,64	0,858	18,733
Differenz	—	—	0,63	0,97	0,160	4,212
Geïsch induzierte Pflanzen						
Apikalteil .	4,136.4	0,209.8	5,06	19,31	0,980	21,820
Basalteil . .	4,290.6	0,201.6	4,70	18,70	0,877	19,585
Differenz	—	—	0,36	0,61	0,103	2,235

Nach einer Geoinduktion von 90 min Summe der Kaliwerte aus Spalte 7:

Ungereizte Hypokotyle (Kontrollen):	Geïsch gereizte Hypokotyle:
22,945	21,820
18,733	19,585
41,678	41,405

werte in beiden Zonen gegenüber den Kontrollen, während nach 90 min in der Spitzenzone ein Absinken der zuvor angetroffenen Kaliumwerte festzustellen ist. Diese Kationenverschiebungen in longitudinaler Richtung des Organs sind bei einem alleinigen Vergleich der Aschenwerte von Ober- und Unterseite der längshalbierten Hypokotyle gar nicht zu erfassen.

Wir können also einmal eine Verschiebung von *Kaliumionen nach der Unterseite des gereizten Organs und gleichzeitig eine longitudinale Kaliumwanderung in vorwiegend basaler Richtung feststellen.*

Dieses Stadium fällt zeitlich zusammen mit dem Auftreten der makroskopisch sichtbaren Aufkrümmung im apikalen Teil des Hypokotyls. Mit dem Fortschreiten der Krümmung finden wir im apikalen Teil weniger Gesamtasche und Kalium als in dem entsprechenden Teil der Kontrollen. Umgekehrt verändern sich die Verhältnisse im basalen Teil des Hypokotyls, Gesamtasche und Kaliumgehalt steigen an. Gleichzeitig rücken die Prozentzahlen für das Trockengewicht und die Gesamtasche — indem nämlich die unteren ansteigen und die der apikalen sinken — näher aneinander (Tabelle 5, Spalte 4/5); die Differenzen der Kaliwerte zwischen basaler und Spitzenzone gehen im geïsch gereizten Hypokotyl gegenüber denen der Kontrollen stark zurück (Tabelle 5, Spalte 7). Wie wir oben (S. 20) schon erwähnt haben, ist das Trockengewicht keine ganz gesicherte Bezugsgröße, da es während der Versuchszeit unkontrollierbaren Veränderungen unterworfen sein kann. Aber auch wenn wir das Frischgewicht für den Vergleich des jeweiligen Kaliumgehaltes zwischen ungereizten und geoinduzierten Hypokotylen wählen, finden wir bei den Kontrollen eine größere Differenz zwischen basalem und apikalem Teil als bei den geïsch gereizten Hypokotylen. Dem Rückgang an Kalium (nach 90 min) im Spitzenteil des geïsch induzierten Hypokotyls entspricht jedoch keine gleich große Zunahme der Basis. Es ist aus der Veränderung der Zahlenwerte nicht mit Sicherheit zu schließen, ob Abnahme in der apikalen Zone und Zunahme in der basalen Zone auf eine basalgerichtete Wanderung des Kaliums während der Georeaktion zurückzuführen sind. Nach unseren Ergebnissen bezüglich der Wiedereinwanderung von Kalium in alternde Tomatenblätter (Bode 1959) kann durchaus mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß bei geïscher Reizung der aus der Wurzel emporsteigende Kaliumzustrom im basalen Teil des Hypokotyls festgehalten wird und hierdurch der Anstieg im Kaliumgehalt hervorgerufen wird. Es fragt sich aber, ob die Leistung der Wurzel während der Versuchszeit hierfür ausreichend ist. Andererseits müßte unter der Annahme, daß eine basal gerichtete Wanderung nicht stattgefunden hat, das Absinken des Kaliumgehaltes im Spitzenteil mit einer Abwanderung in die Kotyledonen oder das Epikotyl in Verbindung gebracht werden.

Versuche mit dekapitierten Hypokotylen[1]

Über das Reaktionsvermögen dekapitierter Hypokotyle von *Helianthus* sind wir durch die Untersuchungen von RUGE (1941) unterrichtet. Die Wirksamkeit des Wuchsstoffes nimmt nach der Dekapitierung innerhalb weniger Tage bis auf ein Minimum ab. BRAUNER (1958) verwendete bei seinen Arbeiten über die Perzeption des geotropischen Reizes gleichfalls durch Dekapitation und mehrtägige Verdunkelung wuchsstoffarm gemachte Hypokotyle. Bei seinen Versuchen ergab sich durch spätere Zuführung einer synthetischen IES-Lösung die Möglichkeit einer zeitlichen Trennung von Reizaufnahme und Krümmungsreaktion. — Die hierbei zutage getretenen Zusammenhänge ließen es wünschenswert erscheinen, die Kationenverteilung und eventuellen Kaliumverschiebungen während der Geoinduktion in dekapitierten und intakten Hypokotylen zu vergleichen. Hierbei ist zu bedenken, daß die Dekapitierung nicht nur zur Unterbindung der Wuchsstoffzufuhr, sondern auch zur Aufhebung aller übrigen Stoffwechselbeziehungen zu den Kotyledonen und der Plumula führt. Die Dekapitierung hat nun, je nachdem man die Hypokotylstümpfe weiter dem Licht-Dunkelrhythmus aussetzt oder sie in vollkommener Dunkelheit beläßt, einen verschiedenen Ablauf der Kationenbewegungen während der Geoinduktion zur Folge.

Tageslichtpflanzen. Drei Tage nach der Dekapitierung sind an querhalbierten Hypokotylen auch hier während der geotropischen Reizung deutlich 2 Phasen in der longitudinalen Verteilung der Kationen zu unterscheiden. Zuerst tritt ein Ansteigen der Kaliumwerte in allen Zonen des Hypokotyls auf (Tabelle 6, Spalte 6). In der zweiten Phase (etwa nach 90 min), während der bei den intakten Pflanzen ein Absinken der Kaliumwerte zu beobachten war, kommt es auch bei den dekapitierten Hypokotylen zu einem Rückgang der Kaliumwerte. Das Ausmaß der hier basal gerichteten Kaliumverschiebung übertrifft das bei den intakten Pflanzen beobachtete bei weitem. So beträgt der Verlust an Kalium bei den in der Versuchsserie der Tabelle 6, Spalte 10, verwendeten 60 Hypokotylen 6 mg K_2O gegenüber den Kontrollen, d. h. pro Hypokotyl 100 γ. Diese beachtliche Kaliummenge ist basalwärts gewandert, aber nicht im basalen Teil des Hypokotyls verblieben, worauf die in den Hypokotylen noch vorhandene Gesamtmenge an Kalium hinweist (Tabelle 6, Spalte 10). Das Kalium kann also nur in die Wurzel weitergeleitet worden sein.

Die Geoinduktion führt in der zweiten Phase also zu einem Abtransport einer beträchtlichen Kaliummenge aus dem Hypokotylstumpf in die unverletzt gebliebene Wurzel. Wenn wir auch über die Wuchsstoff-

[1] Auf Anregung von Herrn L. BRAUNER.

Tabelle 6. *Versuche mit dekapitierten Hypokotylen von Helianthus annuus.* (Tageslichtpflanzen 1 Woche alt, Versuche 3 Tage nach Dekapitierung angesetzt, je 60 Pflanzen, Hypokotyle am Versuchsende *quer*-halbiert)

	1	2	3	4	5		6	7	8	9	10	11
	Frisch-gewicht in g	Trocken-gewicht in g	Trocken-gewicht in Prozenten des Frisch-gewichts	Asche in mg	Asche in Prozenten des Trocken-gewichts	Asche in Prozenten des Frisch-gewichts	K_2O in 100 mg	mg K_2O in 4 g Frisch gewicht	mg K_2O in 200 mg Trocken-gewicht	Differenz	Summe K_2O von Spitze und Basis	CaO in 100 mg Asche
a) Kontrollen												
Spitzenteil .	3,547.7	0,196.5	5,54	37,8	19,24	1,037	40,6	17,300	15,620			10,4
Basalteil . .	3,238.2	0,157.2	4,86	31,9	20,29	0,987	36,0	14,200	14,610	1,010	31,500	15,6
Geïsch induzierte Pflanzen (45 min)												
Spitzenteil .	3,293.7	0,180.2	5,47	36,7	20,40	1,114	41,4	18,448	14,864			9,6
Basalteil . .	3,024.1	0,148.2	4,90	31,1	20,99	1,028	39,2	16,124	16,444	1,580	34,572	14,6
b) Kontrollen												
Spitzenteil .	4,221.5	0,213.5	5,06	43,5	20,37	1,030	42,2	17,312	17,114			7,3
Basalteil . .	4,315.9	0,205.2	4,75	42,8	20,86	0,992	42,0	16,736	17,602	0,488	34,048	7,5
Geïsch induzierte Pflanzen (90 min)												
Spitzenteil .	4,333.1	0,194.2	4,48	39,9	20,55	0,921	36,8	13,552	15,120			10,8
Basalteil . .	4,023.9	0,174.5	4,33	37,4	21,43	0,929	39,0	14,496	16,716	1,596	28,048	9,7

Tabelle 7. *Versuch Hel 22 mit dekapitierten Hypokotylen von Helianthus annuus.* Pflanzen gesät am 12. 6. 59; 18. 6 dekapitiert und in den Dunkelkeller verbracht; Temperatur 18° C. Versuch angesetzt 22. 6. 8^{00} Uhr; Hypokotyle am Versuchsende *quer*-halbiert

	1	2	3	4	5		6	7	8	9	10	11
	Frischgewicht in g	Trockengewicht in g	Trockengewicht in Prozenten des Frischgewichts	Asche in mg	Aschengehalt in Prozenten des Trockengewichts	Aschengehalt in Prozenten des Frischgewichts	K_2O in 100 mg Asche	mg K_2O in 4 g Frischgewicht	mg K_2O in 200 mg Trockengewicht	Differenz	Summe K_2O aus Spalte 7	CaO in 100 mg Asche
Kontrollen (45 Hypokotyle)												
Spitzenteil .	3,036.5	0,145.8	4,80	37,7	25,85	1,241	40,8	20,264	21,100	+0,760	37,504	9,0
Basalteil . .	2,610.3	0,110.6	4,23	28,7	24,98	1,100	39,2	17,240	20,340			10,4
Geïsch induzierte Pflanzen (55 Hypokotyle) 45 min												
Spitzenteil .	3,306.6	0,164.7	4,98	40,4	24,53	1,221	40,6	19,836	19,920	+1,266	36,584	9,2
Basalteil . .	2,573.9	0,115.6	4,49	29,34	25,34	1,138	36,8	16,752	18,654			12,0
Geïsch induzierte Pflanzen (55 Hypokotyle) 90 min												
Spitzenteil .	3,034.3	0,146.5	4,82	36,5	25,95	1,203	40,8	19,332	20,320	+1,198	35,672	7,8
Basalteil . .	2,599.0	0,109.0	4,19	27,0	24,77	1,039	38,6	16,040	19,122			9,3

verhältnisse in der Wurzel zu diesem Zeitpunkt keine durch einen Test belegte Kenntnis haben, so ist doch anzunehmen, daß ihre Wuchsstoffverhältnisse durch die Dekapitierung der Kotyledonen nicht in dem Maße gestört worden sind, wie die des Hypokotylstumpfes. Es hat demnach doch sehr den Anschein, als ob in der Wurzel vorhandener aktiver Wuchsstoff mit diesem Kaliumabtransport in Zusammenhang zu bringen wäre.

Dunkeladaptierte Hypokotyle. Nach der Dekapitierung 3 Tage dunkelgehaltene Hypokotyle lassen nach Eintritt der geotropischen Reizung wohl einen Anstieg der Kaliumwerte im Spitzenteil, nicht aber gleichzeitig im basalen erkennen. Das Auftreten eines Übergewichtes im Kaliumgehalt gegenüber den Kontrollen während der ersten Phase der Reaktion bleibt aus (Tabelle 7, Spalte 10). An seine Stelle tritt ein sich auch in der zweiten Phase fortsetzendes Absinken der Gesamtkaliummenge der geïsch induzierten Hypokotyle.

Inwieweit diese Störung des normalen Reaktionsablaufs der Longitudinalverschiebung des Kaliums in verdunkelten Hypokotylenstümpfen der Wuchsstoffverarmung zuzuschreiben ist, kann vorläufig nicht entschieden werden. Es ist bei der Beurteilung dieser Verhältnisse zu berücksichtigen, daß die verdunkelten Hypokotylstümpfe gegenüber denjenigen, die dem natürlichen Tagesrhythmus ausgesetzt waren, an Kohlenhydraten stark verarmt sind[1] (vgl. den Trockengehalt in Prozent des Frischgewichts, Tabelle 6 und 7, Spalte 3).

Ergänzende Versuche mit Tomatenpflanzen

Wir hatten anfänglich unsere Versuche auch mit jungen Tomatenpflanzen durchgeführt. Bei diesem Versuchsobjekt ergaben sich aber methodische Schwierigkeiten, da im Hypo- und Epikotyl der Tomate

Tabelle 8

Versuch To 5 am 16. 2. 59, Versuchsgewächshaus, 20 14 Tage alte Tomatenpflanzen (Sorte „Haubners Vollendung") wurden von 11^{40}—13^{40} Uhr horizontal gelegt. Dann wurden Sproß und Hypokotyl der Länge nach halbiert und getrennt verascht

	Frischgewicht in g	Trockengewicht in g	Trockengewicht bezogen auf Frischgewicht %	Aschengehalt bezogen auf Trockengewicht %	Aschengehalt bezogen auf Frischgewicht %
Sproßinternodium					
Oberseite . . .	0,733.0	0,035.0	4,77	31,4	1,50
Unterseite . .	1,023.0	0,043.0	4,20	33,0	1,38
Hypokotyl					
Oberseite . . .	1,201.0	0,056.8	4,65	31,3	1,48
Unterseite . .	1,232.6	0,055.4	4,49	30,1	1,35

In 100 mg Asche sind enthalten:

	K_2O	Na_2O	CaO	MgO
Sproßinternodium				
Oberseite	55,6	7,7	15,4	5,2
Unterseite	58,8	8,1	14,5	5,2
Differenz	3,2	0,4	0,9	0,0
Hypokotyl				
Oberseite	56,9	5,6	14,8	5,2
Unterseite	56,9	5,6	14,8	5,2
Differenz	0,0	0,0	0,0	0,0

[1] So benötigt man zur Veraschung der Tageslichtpflanzen 6 Std, während die kohlenhydratarmen verdunkelten Hypokotyle bereits nach 1 Std vollkommen verascht sind.

nur während eines verhältnismäßig kurz bemessenen Entwicklungsstadiums der Anteil des Marks am Gesamtquerschnitt des Organs für die Versuche ähnlich günstig ist wie bei *Helianthus*. Das hat zur Folge, daß von einem bestimmten Alter an Veränderungen im Mineralsalzspiegel, die sich im Rindenmantel abspielen, gegenüber der Aschenmenge des Markgewebes nicht groß genug sind, um bei der Aschenanalyse noch in Erscheinung zu treten. In jungen Tomatenpflanzen (etwa 14tägig), die außer dem Hypokotyl und den beiden Keimblättern 1 bis 2 Folgeblättchen entwickelt haben, kommt es nach Überführung in die geotropische Reizlage zu einer ähnlich starken Einwanderung von Kaliumionen in die Unterseite wie bei *Helianthus*, aber mit einem wichtigen Unterschied. Ein Tomatenpflänzchen, das außer dem Hypokotyl schon über wenigstens ein Sproßinternodium mit Blatt verfügt, zeigt nach dem Horizontallegen die Georeaktion zunächst nur im Sproßinternodium. In diesem Sproßinternodium beobachten wir nach entsprechender Geoinduktion genau wie beim Hypokotyl der Sonnenblume einen *Kaliumüberschuß in der Unterseite*, während in dem gleich lange geïsch gereizten Hypokotyl Ober- und Unterseite noch die *unveränderte gleiche Kaliummenge* aufweisen. Dieses Verhalten ist besonders bemerkenswert, da auch im Hypokotyl eine Frischgewichtszunahme der Unterseite zu beobachten war. Wenn also die erhöhte Wasserpermeabilität im Rindengewebe der Unterseite für den Kaliumeinstrom allein verantwortlich zu machen ist, wäre dieser Befund schwer zu verstehen.

Besprechung der Ergebnisse

Bei dem Bestreben einen Einblick in das zellphysiologische Geschehen während des Ablaufs der geotropischen Reaktion zu gewinnen, sind verschiedene Wege eingeschlagen worden. Einmal hat man versucht, durch Einwirkung von außen dargebotener Plasmolytica etwas über die osmotische Verhaltensweise der Gewebe geotropisch gereizter Organe zu erfahren (WARNER 1931, STRUGGER 1932), während andere Untersuchungen auf die unmittelbare Erfassung der durch den Schwerereiz ausgelösten stoffwechselphysiologischen Veränderungen im Organ ausgegangen sind. Auf diesem Gebiet verdanken wir METZNER (1934) und GUNDEL (1933) wesentliche Beiträge. Auf Grund von Preßsaftbestimmungen konnten sie an Längshälften geotropisch gereizter Hypokotyle von *Helianthus annuus* eine ganze Anzahl von verschiedenen Veränderungen im Stoffwechsel von Ober- und Unterseite feststellen. Aus der Reihe dieser Ergebnisse steht für uns hier die Erwähnung des Vorliegens eines höheren Elektrolytgehaltes der *Oberseite* im Vordergrund des Interesses. Dieser Befund muß heute in Verbindung mit der noch ganz im Fluß befindlichen Vorstellung von der Wuchsstoffaktivierung gesehen werden. RUGE (1941) berichtete noch von

verschiedenen Wuchsstoffmengen in beiden Hälften des geotrop gereizten Hypokotyls von *Helianthus*. Inzwischen sah man sich auf Grund neuer Tatsachen veranlaßt, das Bild einer Wuchsstoffquerverschiebung aufzugeben. An ihre Stelle trat die Vorstellung einer Erhöhung des Aktivitätsgrades des Wuchsstoffes in der Unterseite durch Cofaktoren (REISENER 1957). Bei der Analyse des geotropischen Reizvorgangs kommt BRAUNER (1958) zu folgender Vermutung: „Auch andere leicht wandernde Ionen des Gewebes könnten hier eine Rolle spielen, deren Gegenwart die Wirksamkeit des Wuchshormons direkt oder indirekt beeinflußt, etwa K und Ca (THIMANN und SCHNEIDER 1938; COOIL und BONNER 1957)." Mit dem Auftreten von aktiviertem Wuchsstoff scheint es andererseits zu einer Erhöhung der Wasserpermeabilität zu kommen. Es fragt sich nun, in welcher Weise diese Veränderung sich auf eine eventuelle Wanderung von Elektrolyten, insbesondere des Kaliums, auswirkt. Dem Kaliumion kommt hierbei unter den Kationen infolge seiner großen Beweglichkeit eine bevorzugte Stellung zu (CHOLODNYJ 1923).

Die in geotropisch gereizten Organen auftretenden Potentialdifferenzen und die durch sie möglicherweise induzierte Ionenwanderung haben Anlaß zu verschiedenen Arbeitshypothesen zur Erklärung des Geotropismus gegeben. Diesen Fragenkomplex hat BRAUNER (1927, 1928, 1956) ausführlich diskutiert.

Die von uns im Verlauf der Georeaktion im Hypokotyl von *Helianthus* beobachtete vermehrte Einwanderung von Kaliumionen in die Gewebe der Unterseite kann nicht identisch mit der beim „Geoelektrischen Phänomen" vor sich gehenden Kationenverlagerung sein, dem widerspricht schon der Zeitpunkt ihres Eintritts sowie auch ihr Ausmaß. Die Feststellung einer Verschiebung der Kalium-Calcium-Relation nach der Seite des *Kaliums* erscheint wichtig. Es liegt nahe, eine Beziehung zwischen dem Auftreten des Kaliumübergewichtes und der Wuchsstoffaktivierung zu erwägen. Aber gerade der zeitliche Ablauf beim Zustandekommen des Überschusses an Kaliumionen in den Geweben der Unterseite macht es wahrscheinlich, daß die vermehrte Einwanderung von Kaliumionen nicht Anlaß, sondern Folge der auxinbedingten Erhöhung der Wasserpermeabilität ist. Der Überschuß läßt sich jedenfalls mit der von uns verwendeten flammenphotometrischen Methode erst nach frühestens 30 min registrieren. So gesehen könnte man den von uns an längshalbierten Hypokotylen von *Helianthus* nachgewiesenen Kaliüberschuß der Asche der Unterseite als Folge einer durch die Permeabilitätserhöhung begünstigten Sedimentierung interpretieren. Dem widerspricht aber, daß die Gesamt-Kaliumkonzentration in der Asche von 45 min geïsch gereizten Hypokotylen höher ist als in den Kontrollen (vgl. Tabelle 4). Unsere ergänzenden Versuche mit jungen Tomatenpflanzen haben außerdem die Tatsache zutage gefördert, daß bei

Vorhandensein eines reaktionsfähigen Sproßgliedes über dem Hypokotyl die Kaliumverschiebung im Hypokotyl unterbleibt. Sie unterbleibt, obwohl die Unterseite des Hypokotyls eine deutliche Frischgewichtszunahme erkennen läßt (Wassereinstrom in die Gewebe der Unterseite)[1].

Mit einer Erklärung des Vorgangs als reine Diffusionserscheinung kommen wir bei der in *longitudinaler* Richtung eintretenden Veränderung der Kaliumkonzentration, die wir in den Versuchen mit querhalbierten Hypokotylen gefunden haben, noch weniger aus. Im ungereizten Hypokotyl besteht für das Kalium von den Kotyledonen zur Basis hin ein bestimmtes Konzentrationsgefälle, das an bedeckten Tagen bemerkenswerterweise größer war als an Sonnentagen[2]. — Bei dem Mineralsalzspiegel der einzelnen Längszonen des Hypokotyls scheint es sich um ein sehr labiles Gleichgewicht zu handeln, das bei eintretender geotropischer Reizung alsbald verschoben wird. Denn gleichzeitig mit der in der Anfangsphase der Georeaktion wahrnehmbaren Erhöhung der Kaliumkonzentration im apikalen Teil des Hypokotyls ist eine solche in der basalen Zone feststellbar. Die Summe der in den beiden Längszonen anzutreffenden Kaliummengen ist in der ersten Phase der Reaktion in den gereizten Hypokotylen größer als in den Kontrollen. Schließlich deutet das 90 min nach Reizbeginn einsetzende Absinken der Kaliummengen in der apikalen Zone — nach Auftreten der sichtbaren Aufkrümmung — darauf hin, daß hier andersartige Beziehungen die steuernde Rolle übernehmen. Hängt dieser Rückgang der Kaliumkonzentration mit einer Inaktivierung des Wuchsstoffs zusammen? Leider liegen meines Wissens konkrete Angaben über den Grad der Wuchstoffaktivierung in den einzelnen Phasen der Georeaktion bisher noch nicht vor.

In dekapitierten, jedoch am Tageslicht belassenen Hypokotylen spielt sich der Vorgang der Longitudinalverschiebung von Kalium während der geotropischen Reizung ähnlich wie in der intakten Pflanze ab, nur mit dem Unterschied, daß in der zweiten Phase die Senkung des Kaliumwertes sich auf das ganze geïsch induzierte Hypokotyl erstreckt. Ein Vergleich der im gereizten Hypokotyl vorhandenen Gesamtmenge an Kalium mit der in den Kontrollpflanzen deutet auf eine erhebliche Kaliumabwanderung in die Wurzel hin. Es wäre daran zu denken, daß das Kalium nur deshalb nach der Wurzel wandert, weil nach der Dekapitierung und der damit verbundenen Unterbrechung der Wuchsstoffzufuhr hier die relativ größere Menge aktiven Wuchs-

[1] Ob eine K-Verschiebung eintritt, wenn die geotropische Reaktion auf diese Zone übergreift, ist noch nicht untersucht worden, sie ist aber zu erwarten.

[2] Hier besteht vielleicht ein Zusammenhang mit dem von GUTTENBERG (1956) bei Zylindern von *Helianthus*-Hypokotylen gefundenen Einfluß von Licht und Dunkelheit auf den Transport von IES.

stoffes vorhanden ist. — Unsere Annahme, daß der Rückgang der Kaliumwerte im Spitzenteil des intakten Hypokotyls auf die Abwanderung einer gewissen Menge von Kalium in die Kotyledonen zurückzuführen sei, gewinnt durch diesen Befund an Wahrscheinlichkeit.

In dekapitierten, durch Verdunkelung wuchsstoffarm gemachten Hypokotylen ähnelt die Verteilung des Kaliums eher der im ungereizten Organ. Die im intakten Hypokotyl anzutreffende Longitudinalverschiebung ist hier sichtlich gestört. Bei fast gleichbleibender Konzentration des Kaliums im apikalen Teil, sinken seine Anteile im Basalfeil wie auch seine Gesamtmenge gegenüber den Kontrollen ab.

Ich möchte der Feststellung der Verschiebung der Kaliumkonzentration in longitudinaler Richtung ein größeres Gewicht beilegen als der Ansammlung von Kalium in der Unterseite des Organs, die man sich auch als Sekundärerscheinung der Longitudinalverschiebung vorstellen könnte. Hierin bestärkt mich die Tatsache, daß bei den Versuchen mit längsgespaltenen Hypokotylen die Kaliumwerte der Oberseite anfänglich über denen der Kontrollen liegen und es deshalb zweifelhaft erscheinen muß, ob die in die Unterseite vermehrt einwandernden Kaliumionen durch eine Querverschiebung dorthin gelangt sind.

Unsere Versuche dürften gezeigt haben, wie notwendig die Untersuchung der Veränderungen des Mineralsalzspiegels in den an der Georeaktion beteiligten Gewebezonen der *intakten Pflänze* ist. Trotz ihres rein hypothetischen Charakters scheint die eingangs erwähnte Vorstellung eines durch die Wuchsstoffaktivierung ausgelösten Acceptormechanismus mit den im Hypokotyl von *Helianthus* vorgefundenen Verhältnissen im Einklang zu stehen.

Zusammenfassung

1. Es wird die Verteilung der Kationen, insbesondere des *Kaliums*, im ungereizten und im geïsch induzierten Hypokotyl von *Helianthus annuus* verglichen.

2. Eine Woche alte, geotropisch induzierte Hypokotyle von *Helianthus*, die der Länge nach in Ober- und Unterseite halbiert worden sind, weisen in der *unteren* Hälfte ein Ansteigen der Kaliumkonzentration in der Gesamtasche gegenüber der Oberseite auf. Der Kaliumüberschuß beträgt nach 90 min Induktion etwa 5% der Gesamtkaliummenge.

3. An ungereizten Hypokotylen ist in *longitudinaler* Richtung ein Abfall der Gesamtaschenmenge von den Kotyledonen zur Basis hin festzustellen. In gleicher Richtung nimmt auch der K-Gehalt der Asche ab.

4. Zu Beginn der Geoinduktion steigt der Kaliumgehalt im Hypokotyl gegenüber dem der Kontrollen an. Die Zunahme erstreckt sich sowohl auf den apikalen wie auf den basalen Teil des Hypokotyls.

5. Im weiteren Verlauf der Georeaktion sinken die Kaliwerte in der Spitzenzone, während die der basalen Zone zunehmen. Hierdurch wird der im ungereizten Hypokotyl zwischen Apikal- und Basalteil feststellbare Gradient der Kalikonzentration stark verringert.

6. An dekapitierten, bei Tageslicht weiterkultivierten Hypokotylen läuft der Vorgang der longitudinalen Kaliumverschiebungen während der Georeaktion ähnlich ab wie in einer intakten Pflanze. Jedoch greift in der zweiten Phase der Reaktion der Abfall der Kaliumwerte im Spitzenteil auf die Basis über, wodurch die Gesamtmenge des im Hypokotyl vorhandenen Kaliums unter diejenige in den Kontrollen sinkt. Es muß somit eine Abwanderung von Kalium aus dem Hypokotylstumpf in die Wurzel stattgefunden haben.

7. In dekapitierten, durch dreitägige Verdunkelung wuchsstoffarm gemachten Hypokotylen ist die normal anzutreffende Longitudinalverschiebung des Kaliums in beiden Phasen deutlich gestört.

8. Ergänzende Versuche mit Keimpflanzen von Tomaten ergaben, daß bei Vorhandensein eines reaktionsfähigen Internodiums über dem Hypokotyl die Kaliumeinwanderung nur in die Unterseite des Internodiums, nicht aber in die Unterseite des Hypokotyls erfolgt.

9. Im Ablauf der Georeaktion ist gleichzeitig mit der Verschiebung von Kaliumionen nach der Unterseite des gereizten Organs eine longitudinale Wanderung des Kaliums vorwiegend in basaler Richtung zu beobachten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die fortlaufende Unterstützung meiner Arbeiten. — Die flammenphotometrische Bestimmung wurde wiederum von Frl. Dr. E. LEIDENFROST vom Institut für Bodenkunde und Pflanzenernährung in Geisenheim liebenswürdigerweise ausgeführt, während ich bei der Durchführung der Versuche von Frl. JUTTA ALBRECHT unterstützt wurde. Beiden sei herzlich gedankt.

Literatur

BODE, H. R.: Über den Einfluß des Heteroauxin auf die Kationenzusammensetzung der Blattasche der Tomate. Planta (Berl.) **53**, 212—220 (1959). — BRAUNER, L.: Untersuchungen über das geoelektrische Phänomen. Jb. wiss. Bot. **66**, 381—428 (1927). — Untersuchungen über das geoelektrische Phänomen II. Membranstruktur und geoelektrischer Effekt. Ein Beitrag zum Permeabilitätsproblem. Jb. wiss. Bot. **68**, 711—770 (1928). — Symp. Soc. exp. Biol. **11**, 86—94 (1956). — BRAUNER, L., u. A. HAGER: Versuche zur Analyse der geotropischen Perzeption I. Planta (Berl.) **51**, 115—147 (1958). — CHOLODNYJ, N.: Über den Einfluß der Metallionen auf den Geotropismus der Wurzeln. Beih. bot. Zbl. **39**, 222—239 (1923). — COOIL, B. C., and J. BONNER: The nature of growth inhibition by Calcium in the Avena coleoptile. Planta (Berl.) **48**, 696—723 (1957). — GUNDEL, W.: Chemische und physikalisch-chemische Vorgänge bei einer geïschen Induktion. Jb. wiss. Bot. **78**, 623—664 (1933). — GUTTENBERG, H. v., u. K. ZETSCHE: Der Einfluß des Lichtes auf die Auxinbildung. Planta (Berl.) **48**, 99—134 (1956). — METZNER, P.: Zur Kenntnis der Stoffwechseländerungen bei geotropisch gereizten

Keimpflanzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **52**, 506—522 (1934). — Pohl, R.: Versuche zur Analyse des Wuchsstoff-Primäreffektes bei der Zellstreckung. Physiol. Plant. (Cph.) **10**, 681—696 (1957). — Reisener, H. J.: Versuche zum Geotropismus mit radioaktiver β-Indolylessigsäure. Naturwiss. **44**, 120 (1957). — Ruge, U.: Über die geotropische Aufkrümmung dekapitierter Helianthuskeimlinge. Planta (Berl.) **32**, 176—186 (1941). — Strugger, S.: Die Beeinflussung des Wachstums und des Geotropismus durch die Wasserstoffionen. Ber. dtsch. bot. Ges. **50**, 77—92 (1932). — Thimann, K. V., and Ch. L. Schneider: The role of salts, hydrogen ion concentration and agar in the response of the Avena coleoptile to auxins. Amer. J. Bot. **25**, 270—280 (1938). — Warner, Th.: Über den Einfluß von Salzen auf die geotropische Reaktion. Planta (Berl.) **12**, 635—669 (1931).

Dr. H. R. Bode,
Lehr- und Forschungsanstalt für Wein-, Obst- und Gartenbau, Geisenheim a. Rh.
Abt. Experiment. Soziologie der Kulturpflanzen

Planta 54, 34—67 (1959)

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. H. Ullrich)

URSACHEN DER FROSTRESISTENZ BEI WINTERWEIZEN

III. Mitteilung

DIE BEDEUTUNG VON PROTEINEN FÜR DIE FROSTRESISTENZ

Von

Ulrich Heber

Mit 15 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Juli 1959)

Einleitung

Die Kolloidtheorie der Frostresistenz (u. a. Andersson 1944) sagt aus, daß wasserbindende Zellkolloide dem Wasserentzug durch Frost entgegenwirken und ihre Menge daher ausschlaggebend für den Grad der Frostresistenz ist. Untersuchungen an den Kolloiden der Zelle wurden aber — offenbar aus experimentellen Gründen — bisher nur in beschränktem Umfange vorgenommen (Siminovitch und Briggs 1949, 1953; s. a. Levitt 1956). Kurz zusammengefaßt, ergaben sie widersprechende Befunde bezüglich eines Zusammenhangs von Frostresistenz und Gesamteiweißgehalt, während der Gehalt an wasserlöslichen Proteinen Parallelen zur Ausbildung der Frostresistenz aufweisen soll. Einige Autoren vermuteten auch Beziehungen zwischen dem Glykoproteidgehalt und der Resistenz (Tonzig 1937, Levitt 1954, Jeremias 1956 und Henze 1959).

An Kolloiden liegen in der Zelle vorwiegend Eiweißstoffe vor. Wie die Analyse ergab, gilt dies ganz besonders für die Weizenzelle, da wir hier an hochmolekularen Zellbestandteilen nur Proteine, Proteide und in geringem Maße Fruktosane fanden.

In der vorliegenden Untersuchung wird der Versuch unternommen, die Proteine der Zelle — soweit methodisch möglich — zu trennen, Schwankungen der Menge während der Zeit des Resistenzerwerbs zu verfolgen und dann deren Bedeutung für das Frostresistenzproblem zu beleuchten.

Material und Methode

1. Versuchsanordnung. Wie bereits für die Zuckeruntersuchung näher ausgeführt (Heber 1958a), wurden 3 Versuche vergleichend betrachtet: Ein Feldversuch umfaßt zu Beginn der Analysen im Januar frostresistentes, im Herbst ausgesätes Weizenmaterial, dessen Resistenz mit Anbruch wärmerer Witterung abnimmt. Daneben kommen Pflanzen eines Gewächshausversuches zur Analyse, die teils während der Untersuchung infolge von Kälteeinlaß ins Anzucht-Gewächshaus

frostresistent wurden (Gewächshausversuch „kalt" oder Härtungsversuch), teils als Kontrolle bei etwa 15° C gehalten wurden und somit frostempfindlich blieben (Gewächshausversuch „warm" oder Kontrollversuch). Weiter kamen auch Pflanzen zur Untersuchung, die in der Kältekammer bei Temperaturen zwischen + 2° C und —2° C abhärteten. Diese Pflanzen wurden im Gewächshaus ausgesät und nach 14 Tagen Anzucht bei etwa 15° C in die Kältekammer gebracht. Dort wurden sie von Osram-HNG-Lampen tagsüber beleuchtet (6×40 W/m² in 80 cm Entfernung von den Pflanzen).

2. Eiweißextraktion. Bei der Extraktion von Zelleiweißen ist es schwierig, Artefakte sicher auszuschließen, die darauf beruhen können, daß bei der Extraktion ein fermentativ bedingter Proteinabbau stattfindet. Dabei müßten die Bausteine der Proteine, nämlich Aminosäuren, auftreten. Da ein vermehrtes Auftreten von Aminosäuren gegenüber der Kontrolle, bei der durch Eiweißdenaturierung eine Fermentwirkung ausgeschlossen war (Alkoholextraktion), nicht beobachtet werden konnte, scheint der Schluß voll berechtigt, daß bei der hier gewählten Proteinextraktion keine sehr wesentlichen fermentativen Umsetzungen der Proteine vor sich gehen.

Nach orientierenden Versuchen entschieden wir uns dafür, die Eiweiße mit sehr schwachem Alkali zu extrahieren. Dieses Verfahren hat gegenüber der Extraktion mit Puffer den Nachteil, daß die Gefahr der Alkalidenaturierung besteht, solange nicht die herausgelösten Proteine selbst puffernd wirken. Diese Gefahr wurde durch schnelles Arbeiten in der Kälte soweit als möglich gebannt. Die Alkalimenge stellten wir so ein, daß der Extrakt einen p_H-Wert zwischen 7,5 und 8,5 aufwies (etwa 2 mg NaOH/g Frischgewicht Weizenblätter). Ein Arbeiten mit Puffer war nicht möglich, da die notwendige Konzentrierung der Eiweiße durch Vakuumdestillation zu starker Elektrolytanhäufung geführt hätte. Verschiedene Autoren extrahierten Pflanzenproteine mit Wasser. Gegen dieses Verfahren sind jedoch erhebliche Einwände möglich, weshalb es von uns nicht in Betracht gezogen wurde (vgl. S. 62).

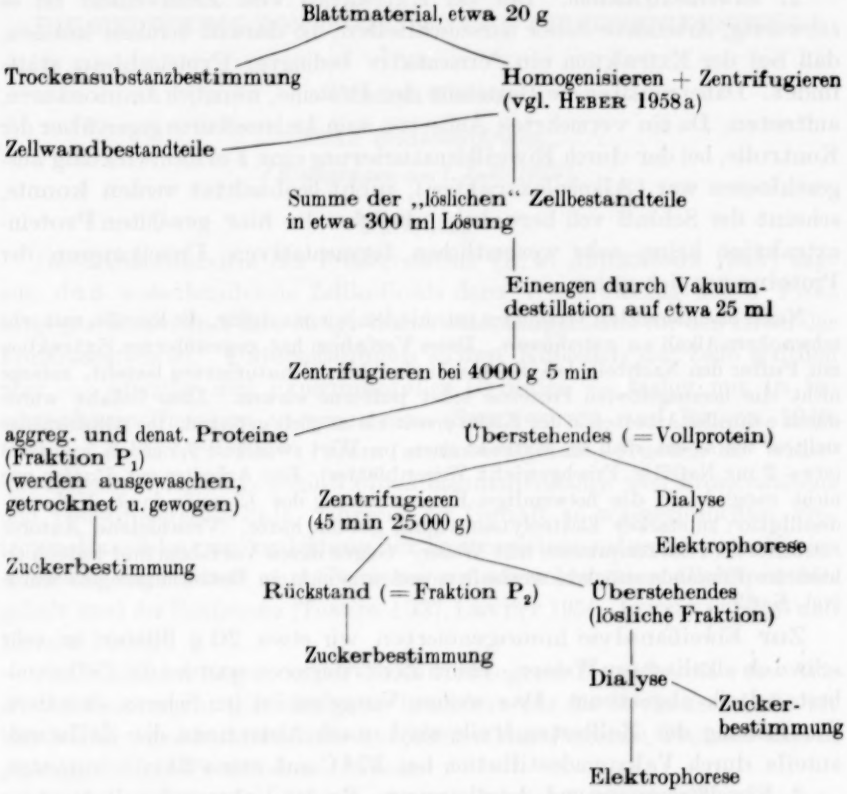
Zur Eiweißanalyse homogenisierten wir etwa 20 g Blätter in sehr schwach alkalischem Wasser. Durch Zentrifugieren wurden die Zellwandbestandteile abgetrennt. Das weitere Vorgehen ist im Schema skizziert. Die Lösung der Zellbestandteile wird nach Abtrennen des Zellwandanteils durch Vakuumdestillation bei 37° C auf etwa 25 ml eingeengt.

3. Eiweißtrennung und -bestimmung. Bei der Vakuumdestillation der Extraktionslösung aggregiert ein kleiner Teil der Eiweiße, der sich durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 4000 g entfernen läßt (Fraktion P_1). Ein Teil der dunkelgrün gefärbten überstehenden Lösung („Vollprotein") wird gegen Veronalpuffer von p_H 8,0 48 Std dialysiert und im Antweiler-Gerät mikroelektrophoriert, ein weiterer Teil 45 min bei 25000 g zentrifugiert. Dabei sedimentiert ein Teil der Plasmaeiweiße. Das Sediment soll Fraktion P_2 genannt werden und dürfte dem von LUBIMENKO (1921) zuerst beschriebenen und von STOLL und WIEDEMANN (1938) näher untersuchten Chloroplastin weitgehend ähnlich sein. Vermutlich besteht es nicht nur aus den grün gefärbten Chloroplasteneiweißen, sondern

enthält die Gesamtheit der strukturaufbauenden Eiweißkörper der Zelle. Darauf wird noch zurückzukommen sein.

Die gegen Veronalpuffer dialysierte, braun gefärbte überstehende Lösung gelangt ebenfalls zur Elektrophorese nach ANTWEILER. Sie stellt etwa die „Cytoplasma"fraktion nach WILDMAN und BONNER (1947) dar,

Schema. *Die Aufarbeitung des Blattmaterials zur Eiweißanalyse*



doch bestehen begründete Zweifel, daß nur Eiweißbestandteile des Cytoplasmas in ihr enthalten sind (vgl. S. 42).

Anfänglich war versucht worden, eine Proteinauftrennung auf papierelektrophoretischem Wege zu erreichen. Diese Versuche schlugen fehl, da ein großer Teil der hochmolekularen Pflanzenproteine vom Papier (Schleicher & Schüll Nr. 2043a) adsorbiert wurde und denaturierte. Diese Proteine konnten weder unter milden Bedingungen wieder vom Papier eluiert noch zur elektrophoretischen Wanderung gebracht werden. Auch Glasfaserpapier adsorbierte einen erheblichen Teil der Proteine, obwohl die Wirkung nicht so ausgeprägt war wie die des Cellulosepapieres. Außerdem störte ein starker elektroendosmotischer Effekt. Auf acetyliertem Papier von Schleicher & Schüll wanderten die Proteine zwar, doch war das Papier

zu hydrophob, um eine genügende Menge Proteinlösung aufnehmen zu können. Schließlich wurde zur freien Elektrophorese nach ANTWEILER übergegangen. Die Konzentrationsbestimmung der Eiweiße geschieht in der Antweiler-Elektrophorese nach einem interferometrischen Verfahren. Wir führten die Elektrophorese in etwa 15 min bei 80 V, etwa 1,8 mA und einer Temperatur von 4° C durch. Die Reproduzierbarkeit sowohl der Elektrophoreseansätze als auch der Ablesung war recht gut. Es differieren jedoch die Plasmaeiweiße des Weizens im Gegensatz zu den tierischen Serumproteinen in ihrem Ladungsverhalten nur recht wenig, weshalb eine saubere Auftrennung in verschiedene Fraktionen nur schwer zu erreichen ist. Bei unseren Untersuchungen des Jahres 1957 (Feldversuch, Gewächshausversuch sowie Kältekammerversuch) fanden wir bei der elektrophoretischen Auftrennung der löslichen Weizenproteine eine Fraktion, die ihrer Menge nach Parallelen zur Ausbildung der Frostresistenz aufwies. Dieser Befund ließ sich jedoch weder bei späteren Frosthärtungsversuchen in der Kältekammer noch im Jahre 1958 im Freilandversuch bestätigen, weshalb auf eine Darstellung verzichtet wurde.

Die Antweiler-Elektrophorese gestattet neben der Auftrennung einzelner Fraktionen eine quantitative Eiweißbestimmung in der untersuchten Lösung. Zur Umrechnung auf den Eiweißgehalt der Pflanze mußte dabei die während der Dialyse aufgenommene Flüssigkeitsmenge berücksichtigt werden.

Das Gesamteiweiß der Pflanze erhielten wir aus der Summe der gravimetrisch ermittelten, bei der Aufarbeitung denaturierten Eiweißbestandteile (Fraktion P_1) und des elektrophoretisch (interferometrisch) erhaltenen „Vollproteins". In der Literatur werden meist Eiweißbestimmungen nach KJELDAHL durchgeführt. Davon wurde hier aus mehreren Gründen abgegangen. Bei der Kjeldahl-Analyse läßt sich der Stickstoffgehalt eines Eiweißes mit sehr guter Genauigkeit festlegen. Dann wird mit einem empirischen Faktor multipliziert (meist 6,25), um das Eiweißtrockengewicht zu erhalten. Die Stickstoffgehalte verschiedener reiner Proteine schwanken aber recht beträchtlich. So gibt z. B. ARMSTRONG (1947) für die Hauptfraktionen der Eiweiße von Blutplasma Stickstoffgehalte zwischen 11,9 und 16,1% an, was Faktoren zwischen 8,4 und 6,2 entspricht. Die Brechungszahlen der gleichen Fraktionen liegen dagegen zwischen 1,79 und 1,88, differieren also weit weniger. Dazu kommt noch, daß stickstoffreie prosthetische Gruppen der Proteine (Lipoide, Kohlenhydrate), die offenbar besonders bei der Pflanzenzelle eine erhebliche Rolle spielen, nach KJELDAHL überhaupt nicht angezeigt werden. Diese Fehlerquellen vermeidet die auf der Messung von Brechungszahlen beruhende elektrophoretische Bestimmung, obgleich sie ungenauer ist als die titrimetrische Stickstoffanalyse.

4. Weitere Analysenverfahren. An den 48 Std und länger dialysierten und dann mit Trichloressigsäure gefällten Eiweißen der löslichen Fraktion und des „Vollproteins" sowie an den auszentrifugierten Fraktionen P_1 und P_2 wurden Kohlenhydratbestimmungen nach MORRIS (1948) mit Anthron durchgeführt, um Glykoproteidzucker zu erfassen.

Außerdem wurden an Eiweiß gebundene Zucker durch Hydrolyse freigesetzt und anschließend chromatographisch bestimmt (HEBER 1958).

Die Art der Hydrolyse ist von großem Einfluß auf die Menge und Zusammensetzung der freigesetzten Zucker. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse einer Hydrolyse der Fraktion P_2 mit verschieden starker Schwefelsäure (25 min bei 100° C) dargestellt. Schwefelsäure wurde als Hydrolyseagens verwandt, da sie im Gegensatz zu Salzsäure bei der Chromatographie des Hydrolysates nicht stört und deshalb nicht entfernt werden muß. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, wird Fructose durch konzentriertere Säure zerstört, während andere Zucker erst unter härteren Bedingungen freigelegt werden können.

Tabelle 1. *Die Abhängigkeit der Menge freigelegten Zuckers von der Acidität bei der Hydrolyse der Fraktion P_2*

Zucker in % des Proteingewichtes	Hydrolyse mit		
	2 n	n	n/2 H_2SO_4
Fructose	0,4	1,29	1,10
Glucose + Galaktose	4,74	1,58	1,25
Ribose	0,93	0,25	—
Arabinose	1,04	0,52	0,21

Üblicherweise wurden Proteinhydrolysen zur Abtrennung der Zucker mit $1^1/_2$ n H_2SO_4 35 min bei 100° C im zugeschmolzenen Röhrchen durchgeführt.

Bezüglich der Zellwandsubstanz- und der Frostresistenzbestimmung sowie der Methodik der Frostschutzversuche sei auf HEBER (1958a) verwiesen.

5. Gaswechselversuche. Um die Reaktion des Assimilations- und des Dissimilationssystems von resistenten und empfindlichen Pflanzen auf starkes Frosten zu prüfen, setzten wir folgende Versuche an:

Pflanzen wurden in geschlossenen Pappgefäßen langsam (etwa 3—4° C Temperatursenkung pro Stunde) auf Minustemperaturen gebracht, die sie je nach ihrer Frosthärte lebend ertrugen oder bei denen Frosttod eintrat. Anschließend wurde die Temperatur innerhalb von 2 Std auf + 2° C gebracht, worauf die Pflanzen zur Untersuchung bei + 25° C gelangten. Neben den Gefrieransätzen wurden Kontrollen untersucht, die bei einer Temperatur von + 2° C gestanden hatten.

Zweite und dritte Blätter der Pflanzen wurden mit einer scharfen Schere gleichmäßig in etwa 2,5 cm lange Stücke zerschnitten, um den Wundeffekt bei den verschiedenen Ansätzen gleich groß zu halten und auf diese Weise vernachlässigen zu können, und — jeweils zu 120—150 mg — aufrecht in die inneren Einsätze von kegelförmigen Warburggefäßen eingebracht. Der äußere Ring der Gefäße (Hauptraum) wurde mit 4 ml einer Mischung von 90 Teilen 0,1 m $NaHCO_3$-Lösung und 10 Teilen 0,1 m Na_2CO_3-Lösung beschickt (UMBREIT, BURRIS und STAUFFER 1951). Nach der Gleichgewichtseinstellung im Wasserbad des Warburg-Apparates VL von BRAUN/Melsungen bei 25° C wurde in üblicher Weise Assimilation und Atmung gemessen, wobei 30—60minütige Hellperioden mit Dunkelperioden gleicher Dauer wechselten. Zur Ablesung des Manometerstandes während der Dunkelperiode benutzten wir dunkles Grünlicht.

Der Respirationsquotient wurde bestimmt, indem in ein- und demselben Warburg-Gefäß erst der Gesamtgaswechsel gemessen wurde. Dann wurde durch Einkippen einer KJ-Lösung aus der Birne in eine saure Permanganatlösung, die sich im Hauptraum befand, Alkali frei-

gesetzt, das das gebildete CO_2 absorbierte. Anschließend wurde die O_2-Aufnahme gemessen. Der aus der ersten Meßphase berechnete CO_2-Ausstoß ließ sich dann zum O_2-Verbrauch ins Verhältnis setzen (DIXON 1943).

Ergebnisse

1. Frostempfindliches und -unempfindliches Protein. Es zeigte sich, daß aus dem extrahierten Gesamtprotein ein beträchtlicher Anteil durch hochtouriges Zentrifugieren sedimentiert werden konnte. Die Prüfung im Gefrierversuch ergab, daß die überstehende Lösung das Einfrieren offenbar unverändert überstand, während der Eiweißextrakt vor dem Zentrifugieren starke Fällungen zeigte, wenn er eingefroren und dann wieder aufgetaut wurde. Nahmen wir den sedimentierten Proteinanteil in Wasser oder in Puffer auf und froren dann ein, so ergab sich nach dem Auftauen eine nahezu 100%ige Fällung. Damit glauben wir, das letzten Endes entscheidende frostempfindliche Prinzip der Zelle gefaßt zu haben.

Im folgenden soll die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen erörtert werden.

Die abzentrifugierbare, partikuläre Fraktion setzt sich zusammen aus der beim Zentrifugieren des „Vollproteins" sedimentierten Fraktion P_2 und dem bei der Aufarbeitung aggregierten und denaturierten Anteil der Eiweiße (Fraktion P_1)[1]. Es existieren mehrere Gründe dafür, diese beiden Proteinanteile in einer Fraktion zusammenzufassen, womit keineswegs gesagt werden soll, daß diese etwa einheitlich wäre:

1. Beide Proteinanteile sehen grün aus, enthalten also Chloroplasteneiweiße, während die lösliche Fraktion („Cytoplasma"fraktion) bräunlich gefärbt ist.

2. Beide Proteinanteile enthalten etwa die gleiche Menge chemisch gebundenen (nicht dialysierbaren und bei der Elektrophorese nicht abtrennbaren) Zucker, während die lösliche Fraktion wesentlich zuckerärmer ist.

3. Beide Proteinanteile sind gegen Temperatur- und p_H-Einflüsse äußerst empfindlich, was sich schon darin ausdrückt, daß wenigstens der zweite Anteil bei der Aufarbeitung aggregiert ist. In verschiedenen Aufbereitungen des gleichen Blattmaterials ist dieser Anteil einmal größer, einmal kleiner, aber immer ergibt sich zusammen mit dem in Lösung verbleibenden Anteil eine konstante Endmenge.

[1] Es wurde tatsächlich nicht das gravimetrisch bestimmte sedimentierte Protein zur Ermittlung der Fraktion P_2 verwendet, da beim Zentrifugieren niedermolekulare Körper mitgerissen werden und die Werte verfälschen, sondern es wurde die Differenz der elektrophoretischen Bestimmung des „Vollproteins" vor und nach dem Zentrifugieren bei 25000 g zur Grundlage der Bestimmung genommen. Sie entspricht sinngemäß der Fraktion P_2.

4. Beide Proteinanteile sind äußerst empfindlich gegen Wasserentzug! Friert man die frisch extrahierte Proteinlösung (bei der noch kein Eiweiß aggregiert und ausgefallen ist) bei -20^0 C ein, so zeigt sich ebenso wie beim Gefrieren des „Vollproteins" nach dem Auftauen, daß der größte Teil des Eiweißes mit allen grünen Proteiden ausgeflockt ist (vgl. auch das Verhalten von Tabakblattprotein, Wildman und Jagendorf 1952). Trennt man aber die beiden Proteinanteile durch Zentrifugieren bei 25000 g vom restlichen Protein ab und friert dann die resultierende lösliche Fraktion ein, ist nach dem Auftauen keine oder nur eine unwesentliche Fällung festzustellen. Neben dem Hinweis darauf, daß also die beiden Proteinanteile zusammengehören, ergibt sich aus diesem Befund, daß die zentrifugierbare Fraktion wohl das frostempfindliche Prinzip der Zelle einschließt. In der Zelle existieren also frostempfindliche und frostunempfindliche Eiweiße. Sofern im feinstrukturierten Plasma die Verteilung beider Eiweiße ungleichmäßig ist, muß gefolgert werden, daß in der Zelle frostempfindliche und frostunempfindliche Bereiche existieren, nämlich solche, die in den betreffenden Bereichen Eiweiße der frostempfindlichen Fraktion einschließen oder nicht.

Wie bereits angeführt wurde, dürfte unsere partikuläre frostempfindliche Fraktion dem Chloroplastin von Stoll und Wiedemann (1938, 1952) weitgehend ähnlich sein. Das Chloroplastin ist elektrophoretisch einheitlich und spaltet erst in der Ultrazentrifuge in 3 Fraktionen auf. Eigene Untersuchungen an der Ultrazentrifuge konnten für die Fraktion P_2 eine Aufspaltung in mindestens 3 Fraktionen bestätigen.

„Vollprotein" wurde gegen Veronalpuffer von p_H 8,0 dialysiert und auf eine Konzentration von 0,8% Eiweiß mit Puffer verdünnt. Das Zentrifugieren wurde an einer Phywe-Ultrazentrifuge bei 20000 U/min vorgenommen[1]. Als Beobachtungsverfahren diente die Töplersche Schlierenmethode. Es konnten 3 Banden beobachtet werden, die allerdings infolge der starken Lichtabsorption durch die grüne Eiweißlösung nur schwer sichtbar und auch nicht scharf waren. Eine quantitative Bestimmung ist mit dem Töplerschen Verfahren in der gegebenen Anordnung nicht möglich.

Leider ist es nicht möglich, die frostempfindliche Fraktion nach der Sedimentation bei 25000 g durch Aufnehmen in Puffer wieder völlig in „Lösung" zu bringen. Beim Zentrifugieren der Suspension, die beim Verreiben des Sedimentes mit Puffer resultiert, bei 4000 g sedimentiert wieder ein kleinerer Teil der Fraktion. Der überstehende Anteil wurde 2 Tage dialysiert und anschließend nach Antweiler elektrophoriert. Bei der interferometrischen Bestimmung ergaben sich Schwierigkeiten, da die kolloidal gelösten, dunkelgrün gefärbten Eiweiße das Licht zu stark streuten und zuviel absorbierten. Sie konnten behoben werden durch Herabsetzen der Eiweißkonzentration der Lösung auf etwa 0,6%

[1] Dem Direktor des Institutes für Pflanzenkrankheiten, Herrn Prof. Dr. Braun, bin ich für die Erlaubnis zur Benutzung der Ultrazentrifuge zu Dank verbunden.

(optimale Auftrennung nach ANTWEILER bei 1,0—1,2%) und Anfärben der Vergleichslösung in der Cuvette mit Janusgrün. Die Auswertung ergab in Übereinstimmung mit den Angaben für Chloroplastin, daß eine klare Abgrenzung von Unterfraktionen nicht möglich, also die Fraktion elektrophoretisch offenbar weitgehend einheitlich ist.

Wir vermuteten nun, daß diese Einheitlichkeit durch Bindungen verschiedener Proteine aneinander (protein-protein-interactions, WAUGH 1954) nur vorgetäuscht ist. Ein Aufbrechen solcher Bindungen soll sich nach SISSAKJAN und Mitarbeitern (1952) bei Plastideneiweißen durch Säuredenaturieren und anschließendes Lösen in 75%igem Alkohol sowie durch Entfernen der Lipoide mittels n-Butanol erreichen lassen. Leider gelang es uns jedoch nicht, auf diese Weise merkliche Mengen der zentrifugierbaren Fraktion, die ja zu einem erheblichen Teil aus Plastideneiweißen besteht, in Lösung zu bringen. Mit Alkali ließ sich jedoch wenigstens ein Teil der Fraktion (etwa 35%) lösen, wobei neben der Alkalidenaturierung offenbar gleichzeitig ein Aufbrechen von Protein-Protein-Bindungen vor sich ging. Aus der Lösung ließ sich nämlich bei 25000 g im Gegensatz zum Verhalten der nicht mit Alkali behandelten Eiweiße kein grün gefärbtes Protein sedimentieren, so daß eine Erniedrigung des Teilchengewichtes angenommen werden muß. Interessant ist weiter, daß alkalidenaturiertes frostempfindliches Protein keine irreversible Frostfällung mehr zeigt. Offenbar hängt die Ausfrierbarkeit weitgehend von der Struktur und dem Teilchengewicht der empfindlichen Partikel ab.

Frostempfindliches Protein ließen wir in 5%iger Natronlauge 3 Tage stehen, worauf die ungelösten Anteile abzentrifugiert wurden. Durch Dialyse gegen Veronalpuffer brachten wir die Lösung auf p_H 8,5 und untersuchten sie dann elektrophoretisch. In der Lösung fanden wir 3 Proteinfraktionen, die im elektrischen Feld mit allerdings nur sehr geringen Geschwindigkeitsunterschieden wanderten und zu je etwa 50, 40 und 10% am gesamten gelösten Protein beteiligt waren. Es ist also auch eine elektrophoretische Fraktionierung der frostempfindlichen Eiweiße möglich.

Aus dem Zentrifugalverhalten der frostempfindlichen Fraktion geht hervor, daß es sich um Teilchen außerordentlich hohen Teilchengewichtes handeln muß. LUBIMENKO (1927) sowie STOLL und WIEDEMANN (1938) betonen den molekularen Charakter des von ihnen untersuchten Chloroplastins, das etwa mit dem frostempfindlichen Eiweiß vergleichbar sein dürfte. Andererseits wird vor allem von ANSON (1941) aus dem Verhalten beim Zentrifugieren gefolgert, daß es sich bei den Teilchen des Chloroplastins nicht um einzelne Moleküle handeln kann, da die Teilchengewichte viel größer sind als etwa beim Riesenmolekül des Tabakmosaikvirus. Wir vermuten, daß die frostempfindliche Fraktion sämtliche strukturaufbauenden Eiweiße der Zelle enthält, und zwar vorwiegend Proteine der Chloroplasten, der Chondriosomen, Mikrosomen und des Zellkernes.

Auf jeden Fall ist nicht anzunehmen, daß die frostempfindlichen Proteine *sekundäre* Aggregationen von Eiweißen niederen Molekulargewichtes (Homogenisationsartefakte) darstellen. Dagegen spricht schon u. a., daß ihr Anteil am Gesamtprotein recht konstant und bei den einzelnen Extraktionen sehr gut reproduzierbar ist. Es muß sich also um direkt aus den Zellbausteinen herausgelöste Stoffe handeln.

In der löslichen Fraktion sind neben Cytoplasmaproteinen mit Sicherheit auch lösliche Proteine der Chloroplasten und wahrscheinlich auch der Kerne und Mitochondrien enthalten. Aus Chloroplastenuntersuchungen geht nämlich hervor, daß in den Chloroplasten lösliche Proteine lokalisiert sind, die sich bei 25000 g nicht sedimentieren lassen (HEBER 1959).

Wie eingangs bereits gesagt, findet beim Einfrieren der löslichen Fraktion im Gegensatz zum Verhalten der zentrifugierbaren Fraktion keine Frostfällung der Proteine statt. Ebensowenig ändert sich das elektrophoretische Verhalten und die Aktivität einiger untersuchter Enzyme, die in der löslichen Fraktion enthalten sind. Das führt uns zu der Annahme, daß der Prozeß des Einfrierens nicht zur Denaturierung der fraglichen Proteine geführt hat. Damit ist die lösliche Fraktion als frostunempfindlich zu bezeichnen.

2. Der Proteinspiegel im Verlauf von Änderungen der Frostresistenz. Der Proteinspiegel in seiner Beziehung zur Frosthärtung wurde ziemlich spät untersucht. Es stehen sich hier widersprechende Befunde gegenüber (LEVITT 1956). In unseren Untersuchungen soll nun versucht werden, möglichst die Gesamtheit der Plasmaproteine zu extrahieren, zu bestimmen und durch Fraktionieren einzelne Bestandteile getrennt zu untersuchen.

In Abb. 1 ist der Gang des Gesamtproteingehaltes der Sorte Criewener 192 im Gewächshausversuch 1956 unter Verwendung verschiedener Bezugsgrößen dargestellt. Bei den Sorten Hauters II und Carsten V wurde im gleichen Versuchsjahr ein ähnlicher Kurvenverlauf erhalten. Abb. 2 gibt zum Vergleich den Resistenzverlauf im Jahre 1956 wieder. Bei der Betrachtung der hier auf das Trockengewicht der Blätter bezogenen Darstellungen des Proteingehaltes scheint es, als ändere sich der Proteingehalt während der Härtung kaum und als bestünde kein wesentlicher Unterschied zwischen Härtungsversuch und Kontrollversuch. Bezieht man aber auf die Zellwandsubstanz, von der anzunehmen ist, daß sie wenigstens in der Härtungsphase ihr Gewicht pro Zelle etwa gleich hält, also eine konstante Bezugsgröße darstellt (Bezugnahme in g Protein pro 100 g Zellwandsubstanz, vgl. auch HEBER 1958b), ergibt sich im Härtungsversuch eine wesentliche Zunahme der Plasmaproteine, während im Kontrollversuch nur geringe Schwankungen im Proteingehalt zu beobachten sind. Bei der Bezugnahme auf den Zellinhalt

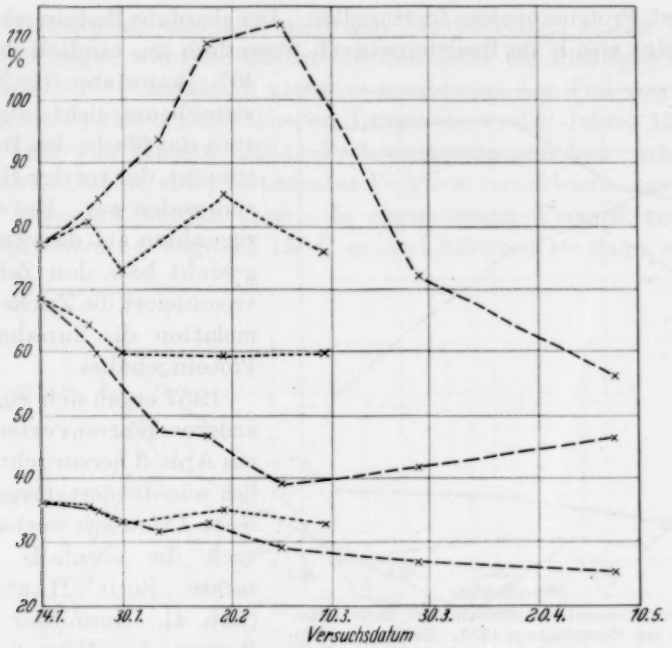


Abb. 1. Der Gesamteiweißgehalt der Sorte Criewener 192 im Versuchsjahr 1959. Oberes Kurvenpaar: Bezugnahme auf die Zellwandsubstanz; mittleres Kurvenpaar: Bezugnahme auf den trockenen Zellinhalt; unteres Kurvenpaar: Bezugnahme auf das Trockengewicht der Blätter. ——— Härtungsversuch; ····· Kontrollversuch

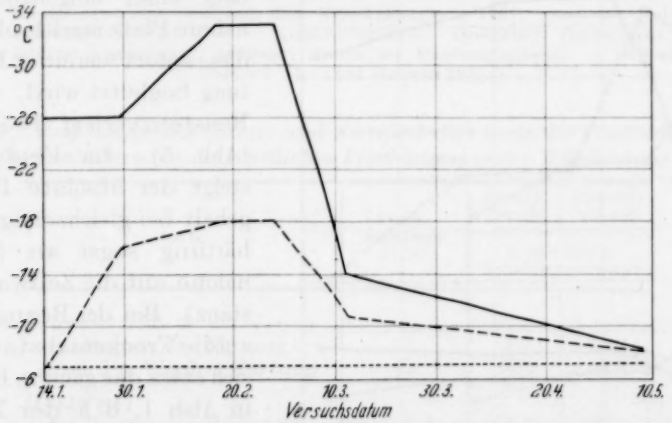


Abb. 2. Resistenzverlauf während der Versuchsperiode 1956. ——— Feldversuch, ——— Härtungsversuch (Gewächshausversuch kalt), ····· Kontrollversuch (Gewächshausversuch warm). Ordinate: Temperatur, bei der 50 % der Blätter überlebten. Abszisse: Zeiten der Probeentnahme. (Aus HEBER 1958a)

(= Trockensubstanz der Blätter minus Zellwandsubstanz), in dem bei der Härtung lebhafte Substanzvermehrung durch Zuckerbildung statt-

findet, ist Proteinabnahme festzustellen. Der absolute Proteingehalt der Zelle steigt also beim Resistenzerwerb wesentlich an, nämlich um über 40%, kann aber der Zuckervermehrung nicht folgen, die etwa das 6fache des Betrages erreicht, der vor der Härtung vorhanden war. Bei der Bezugnahme auf das Trockengewicht bzw. den Zellinhalt verschleiert die Zuckerakkumulation die Zunahme des Proteingehaltes.

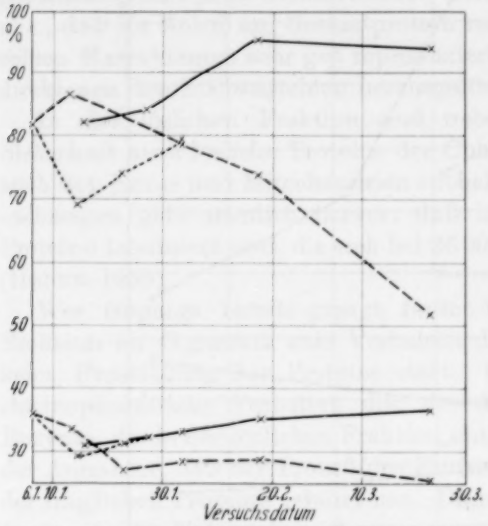


Abb. 3. Der Gesamteiweißgehalt der Sorte Criewener 192 im Versuchsjahr 1957. Zeichen wie in Abb. 1, jedoch zusätzlich: ——— Feldversuch. Eine Bezugnahme auf den Zellinhalt wurde im Gegensatz zu Abb. 1 nicht durchgeführt

1957 ergab sich ein etwas anderer Kurvenverlauf, wie aus Abb. 3 hervorgeht. Ähnlich wie die dort dargestellte Sorte Criewener verhält sich auch die ebenfalls untersuchte Sorte Hauter's II (Abb. 4). Auch hier ist bei Beginn der Härtung eine absolute Proteinzunahme zu verzeichnen, die allerdings bald einer langsamen Abnahme Platz macht, ohne daß diese sofort von einer Enthärtung begleitet wird, wie der Resistenzverlauf 1957 zeigt (Abb. 5). Im Feldversuch steigt der absolute Proteingehalt bei gleichzeitiger Enthärtung sogar an (Bezugnahme auf die Zellwandsubstanz). Bei der Bezugnahme auf die Trockensubstanz zeigt sich etwa das gleiche Bild wie in Abb. 1, d. h. der Zuckeranstieg bei der Härtung überdeckt die Proteinzunahme (vgl. die Zuckeruntersuchungen bei HEBER 1958a).

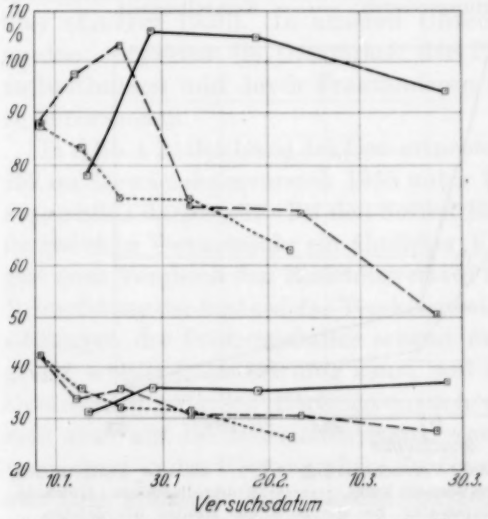


Abb. 4. Der Gesamteiweißgehalt der Sorte Hauter's II im Versuchsjahr 1957. Zeichen wie in Abb. 3

Aus dem Vergleich der Gewächshaus-Härtungsversuche beider Versuchsjahre geht hervor, daß im ersten Jahr bei guter Frostresistenz

(— 18° C maximal) und sehr niedrigen Temperaturen starke Proteinbildung erfolgte, während das im zweiten Jahr bei niedrigerer Frostresistenz (— 15° C maximal) nicht so ausgeprägt der Fall war. Allerdings konnten hier bei den höheren Temperaturen des Jahres 1957 (vgl. Abb. 2 und 5 in HEBER 1958a) Proteinumsetzungen bzw. -abbauvorgänge die Zunahme einer bestimmten Fraktion verschleiern, wie sie aus Abb. 1 vermutet werden kann. In einem neuen Versuch zogen wir Weizenpflanzen 14 Tage bei 15° C an und härteten sie dann erst eine

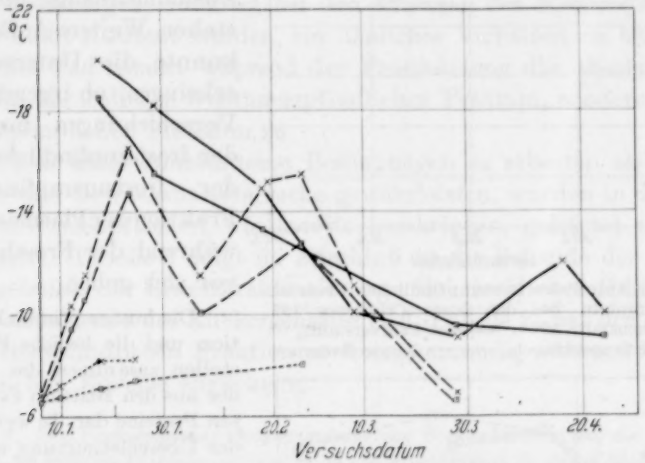


Abb. 5. Resistenzverlauf während der Versuchsperiode 1957. ——— Feldversuch, – – – – Härtungsversuch, ····· Kontrollversuch. Ordinate: Temperatur, bei der 50 % der Blätter überlebten. Abszisse: Zeiten der Probeentnahme. × Criewener 192, □ Hauter's II. (Aus HEBER 1958a)

Tabelle 2. *Änderungen des Zucker- und Eiweißgehaltes sowie der Frostresistenz von Weizenblättern bei der künstlichen Frosthärtung in der Kältekammer*

Sorte	Frostresistenz in °C	Zuckergehalt	Eiweißgehalt
		g pro 100 g Zellwandsubstanz	
Criewener 192			
bei Beginn der Härtung .	— 7	4,7	72,0
nach $3^1/_2$ Wochen Härtung	—14	28,3	69,5
Hauter's II			
bei Beginn der Härtung .	— 6,5	13,5	93,0
nach $3^1/_2$ Wochen Härtung	—13,5	33,6	77,0

Woche bei + 2°C, dann $2^1/_2$ Wochen bei — 2°C. Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse von Eiweiß-, Zucker- und gleichzeitig vorgenommenen Frostresistenzbestimmungen, wobei sowohl Zucker als auch Eiweiße auf die Zellwandsubstanz als konstante Bezugsgröße bezogen wurden. Der Gesamt-

eiweißgehalt hat in diesem Versuch sogar offensichtlich abgenommen bei Erhöhung der Frostresistenz und erheblicher Zunahme des Zuckergehaltes.

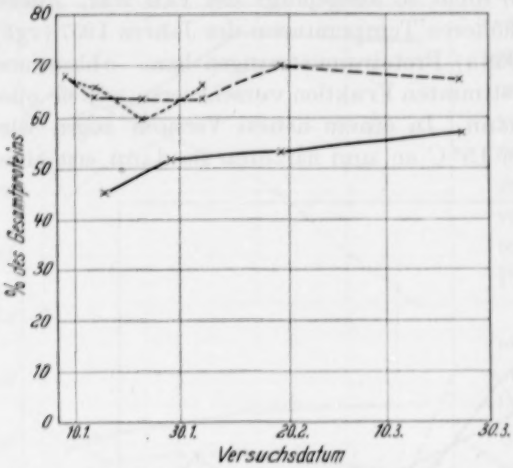


Abb. 6. Der Anteil des frostempfindlichen Proteins am Gesamtprotein bei der Sorte Criewener 192 im Versuchsjahr 1957. ——— Feldversuch, — — — — Härtungsversuch, ····· Kontrollversuch

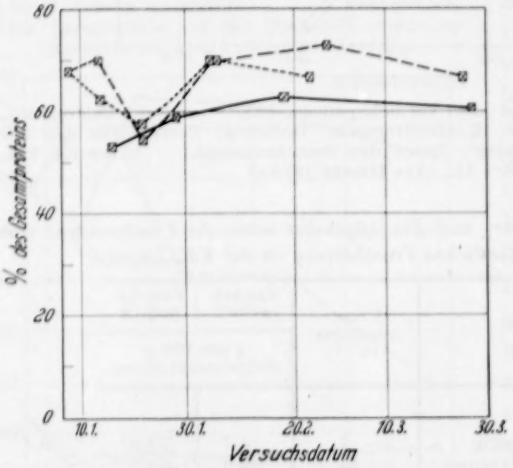


Abb. 7. Der Anteil des frostempfindlichen Proteins am Gesamtprotein bei Hauter's II im Versuchsjahr 1957. Zeichen wie in Abb. 6

Das alles könnte darauf hindeuten, daß die Beziehungen zwischen Frostresistenz und Proteingehalt mehr zufälliger Natur sind und unmittelbare kausale Zusammenhänge nicht bestehen. Weitere Aufklärung konnte die Untersuchung erbringen, ob irgendwelche Verschiebungen innerhalb der frostempfindlichen und der frostunempfindlichen Fraktion der Plasmaeiweiße während der Frosthärtung vor sich gehen.

Die frostempfindliche Fraktion und die lösliche Fraktion stellen zusammen die Summe der aus den Blättern extrahierten Proteine dar. In weitgehender Übereinstimmung mit Angaben von CROOK und HOLDEN (1948) sind das über 95% des Gesamtproteins der Blätter. Der Rest des Proteins, d. h. das nicht extrahierbare Protein, ist in der Zellwandfraktion enthalten. Da es sich praktisch immer um die gleiche Menge handelte, etwa zwischen 6 und 8% der Zellwandsubstanz, wie Kjeldahl-Analysen ergaben, wurde dieser Anteil vernachlässigt.

Abb. 6 gibt für die Sorte Criewener 192 den Anteil der frostempfindlichen partikulären Fraktion am Gesamtprotein in der Versuchsperiode 1957 wieder, Abb. 7 dasselbe für die Sorte Hauter's II. Die Menge an löslichem Protein ergibt sich direkt aus der Differenz der frostempfindlichen Fraktion zu 100. Aus den Abbildungen ist zu ersehen, daß der Gehalt an frostempfindlichem Protein im Feldversuch beträchtlich geringer ist als in den Gewächshausversuchen. Hierzu sei bemerkt, daß

sich im Feldversuch unter entsprechenden Temperaturbedingungen immer eine beträchtlich höhere Frostresistenz bei bisweilen geringerem Zuckergehalt erreichen ließ als im Härtungsversuch im Gewächshaus oder gar in der Kältekammer. Die Unterschiede im Gehalt an frostempfindlichem Protein zwischen Kontrollversuch (Gewächshausversuch „warm") und Härtungsversuch (Gewächshausversuch „kalt") sind sehr gering. Zwar nimmt bei der Frosthärtung die Menge an frostempfindlichem Protein zugunsten der löslichen Fraktion etwas ab, um dann wieder anzusteigen, doch ist bei den Pflanzen des Kontrollversuches, die gar nicht resistent werden, ein ähnliches Verhalten zu beobachten. Auf jeden Fall nimmt während der Frosthärtung die absolute Menge nicht nur der löslichen frostunempfindlichen Fraktion, sondern auch der frostempfindlichen Fraktion zu.

Um nun unter konstanteren Bedingungen zu arbeiten als sie Feldversuch und Gewächshausversuche gewährleisten, wurden in der Kältekammer Weizenpflanzen, wie bereits beschrieben, gehärtet und dann untersucht. Tabelle 3 zeigt im Anschluß an die Befunde der Tabelle 2 die Ergebnisse der Eiweißfraktionierung. Bei merklicher Erhöhung der Frostresistenz und des Zuckergehaltes (vgl. Tabelle 2) hat der Gehalt an der frostempfindlichen Fraktion noch zugenommen, während die Menge der löslichen Eiweiße zurückging.

Tabelle 3. *Die Verteilung des Gesamtproteins von Weizenblättern auf die partikuläre und die lösliche Fraktion vor und nach der Frosthärtung in der Kältekammer*

Sorte	Frostresistenz in °C	partikuläre Fraktion	lösliche Fraktion
		in % des Gesamteiweißes	
Criewener 192			
bei Beginn der Härtung	— 7	62	38
nach $3^1/_2$ Wochen der Härtung . .	—14	72,4	27,6
Hauter's II	— 6,5	62,6	37,4
nach $3^1/_2$ Wochen Härtung . . .	—13,5	66,1	33,9

Bei verschiedenen Versuchen wurde also gefunden, daß der Eiweißgehalt bei Erwerb der Frostresistenz zunimmt, und zwar im allgemeinen die lösliche, frostunempfindliche Fraktion etwas stärker als die frostempfindliche Fraktion. In einem Versuch steigt jedoch die Menge an frostempfindlichem Protein während der Härtung an und die Menge an frostunempfindlichem Protein nimmt ab. Allerdings erhöhte sich in diesem Versuch die Frostresistenz lediglich auf —13 bis —14° C, dagegen in den Versuchen, in denen Eiweißzunahme beobachtet wurde, bis auf —18° C. Die Erhöhung des Zuckergehaltes war in allen Versuchen der Erhöhung der Frostresistenz etwa, jedoch nicht streng, proportional.

Es ist nun schwer, kausale Schlüsse über die Beteiligung von Eiweißen am Erwerb der Frostresistenz aus solchen Versuchen abzuleiten, da es nicht gelingt, eine Frosthärtung bei Konstanz des Zuckergehaltes durchzuführen und deshalb eine Differenzierung zwischen der Wirkung der Zucker und der gewisser Eiweiße auf die Ausbildung der Resistenz nicht möglich ist. Bereits früher hatten wir festgestellt, daß Zucker einen ausgeprägten Schutzeffekt gegen die Schadwirkung des Frostes zeigen. Ein weiterer Befund weist jedoch deutlich auf eine Beteiligung von Eiweißen an der Resistenzausbildung hin. Im Frühjahr ist bei erneuter wesentlicher Zuckeranhäufung ein starkes Absinken der Frostresistenz zu beobachten (Heber 1958a). Damit parallel geht eine Abnahme des Eiweißgehaltes!

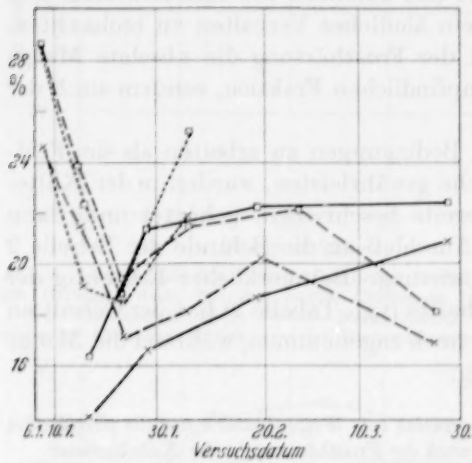


Abb. 8. Der Spiegel der frostempfindlichen Eiweiße im Versuchsjahr 1957 in Prozenten des Trockengewichtes der Blätter. —— Feldversuch, – – – – Härtungsversuch, ·------· Kontrollversuch × Criewener 192, □ Hauter's II

Interessant ist ein Vergleich der Anteile an frostempfindlichem Eiweiß bei den Sorten Hauter's II und Criewener 192 im Versuchsjahr 1957. In allen Fällen ist dieser bei der frostempfindlicheren Sorte Hauter's II merklich höher als bei Criewener 192 (Abb. 8). Zeitlich weniger regelmäßig durchgeführte Eiweißextraktionen des Jahres 1956 ergaben, daß die Sorte Carsten V in der Resistenz *und* im Gehalt an frostempfindlichem Protein eine Mittelstellung einnimmt. Diese Unterschiede können möglicherweise als ursächlich in bezug auf die relativen Resistenzunterschiede der einzelnen Sorten angesehen werden. Die höhere Resistenz von Criewener 192, die bei allen Härtungsgraden zu beobachten ist — auch wenn z. B. Hauter's II einen höheren Zuckergehalt aufweist —, wird damit nicht auf eine bessere Anpassung durch verbesserten Schutzmechanismus zurückzuführen sein, sondern auf eine Reduktion der Menge an frostempfindlichen Substanzen, wodurch sich der vorhandene Schutzmechanismus natürlich effektvoller auswirken muß. So mag es sich dann auch erklären, daß frostresistente Sorten weniger wüchsig sind und auf Wärmeperioden nicht so schnell mit Substanzvermehrung reagieren wie die empfindlicheren Sorten. Wie schon erwähnt wurde, gehören ja die an der Photosynthese beteiligten Fermente wenigstens teilweise zur frostempfindlichen Fraktion. Wenn diese nun bei einer

resistenten Sorte kleiner ist als bei einer empfindlicheren Sorte, ist auch eine geringere Produktionskapazität zu erwarten.

3. Die Bedeutung der Glykoproteide für die Frostresistenz. Auf die mögliche Bedeutung von Glykoproteiden für die Frostresistenz wies TONZIG 1937 hin. Neuerdings gibt JEREMIAS (1956) an, daß der Glykoproteidgehalt frostresistenter Weizensorten höher sei als derjenige empfindlicherer Sorten und mit fortschreitender Enthärtung zurückgeht. Sein Extraktionsverfahren bietet ihm allerdings nicht die Möglichkeit, mehr als höchstens 5% der Plasmaproteine — nämlich nur die hitzestabilen Proteine — zu erfassen, und er stützt sich im wesentlichen auf Färbeversuche. Es mußte nun außerordentlich interessieren, ob sich diese Befunde bei Betrachtung des gesamten Eiweißgehaltes bestätigen lassen.

Es ist schwierig, die freien Kohlenhydrate sauber von den Eiweißen zu trennen. Bei der Trichloressigsäurefällung der Proteine läßt es sich nicht vermeiden, daß beträchtliche Mengen an Zuckern, nämlich bis zu etwa 40% des Eiweißgewichtes (!), mitgerissen werden, wie sich aus dem Vergleich der Zuckeranalysen solcher Fällungen mit den Analysen der dialysierten Proteine ergab. Fällt man aber nach 48stündiger Dialyse, so erhält man Zuckerwerte, die nur wenig vom Zuckergehalt der elektrophoretisch von den freien Zuckern abgetrennten Proteine differieren.

Die elektrophoretische Abtrennung erfolgte hierbei in einem Veronalpuffer-Medium (p_H 8,0) mit Sand als Trägersubstanz. Die proteinhaltige Sandzone wurde nach der Elektrophorese in ein Reagensglas übergeführt und zur Zuckerbestimmung mit Anthron versetzt. Das Verfahren gewährleistet eine saubere Abtrennung von den freien Kohlenhydraten, die bei der Elektrophorese infolge eines elektroendosmotischen Effektes den Proteinen entgegengesetzt wandern, ist aber recht störanfällig (Daten: 400 V, Ionenstärke 0,05, 4 Std Laufzeit). Deshalb wurde eine Zuckergehaltsbestimmung der Proteine nach elektrophoretischer Abtrennung der freien Zucker nur als Zweitbestimmung neben der Kohlenhydratbestimmung nach Dialyse vorgenommen.

Abb. 9 zeigt den Kohlenhydratgehalt der Fraktion „Vollprotein" nach der Dialyse bei der Sorte Criewener 192. Abgesehen von einer Erhöhung des Zuckergehaltes gegen Ende Januar 1957, die aber sowohl im Härtungsversuch als auch im Kontrollversuch vor sich ging, erwies sich der Zuckergehalt bei allen 3 Versuchsansätzen als praktisch konstant und zeigte keinen Gang mit der Frosthärte.

In Abb. 10 ist der Zuckergehalt der Fraktion P_2 (frostempfindliches Protein) und der löslichen Fraktion (frostunempfindliches Protein) dargestellt. Auch bei den frostunempfindlichen Proteinen, unter denen überhaupt nur eine schutzwirksame Eiweißfraktion erwartet werden kann, ist der Zuckergehalt praktisch konstant und unterscheidet sich bei den 3 Versuchsansätzen nicht. Auch ist er wesentlich niedriger als bei den frostempfindlichen Proteinen.

Innerhalb der frostunempfindlichen Fraktion müßte ja ein Prinzip zu suchen sein, das die frostempfindlichen Eiweiße vor dem Einfluß des Gefrierens schützt, vorausgesetzt, daß irgendwelche Eiweiße überhaupt eine Schutzwirkung gegenüber den empfindlichen Plasmaeiweißen erzielen können. Konsequenterweise kann nämlich kaum angenommen werden, daß ein solches Prinzip in der zentrifugierbaren Fraktion selbst existiert, da sich diese ja mit sehr großer Wahrscheinlichkeit in ihrer Gesamtheit trotz der Heterogenität der einzelnen Bestandteile aus frostempfindlichen Proteinen zusammensetzt. Ließe sich das wirksame Prinzip mit der zentrifugierbaren Fraktion sedimentieren, müßte es sich nach dem Auflösen des Zentrifugates und anschließendem Einfrieren als schutzwirksam erweisen und eine Frostfällung verhindern. Tatsächlich wird aber dabei nahezu der gesamte Proteinanteil aggregiert und irreversibel ausgefällt. Also ist anzunehmen, daß sich möglicherweise vorhandene schutzwirksame Proteine nur in der löslichen Fraktion befinden können.

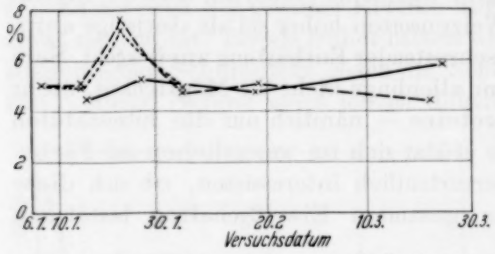


Abb. 9. Der Zuckergehalt von „Vollprotein" von Criewener 192 in Prozenten des Proteins. ——— Feldversuch, – – – – Härtungsversuch, ·-·-·-·-· Kontrollversuch

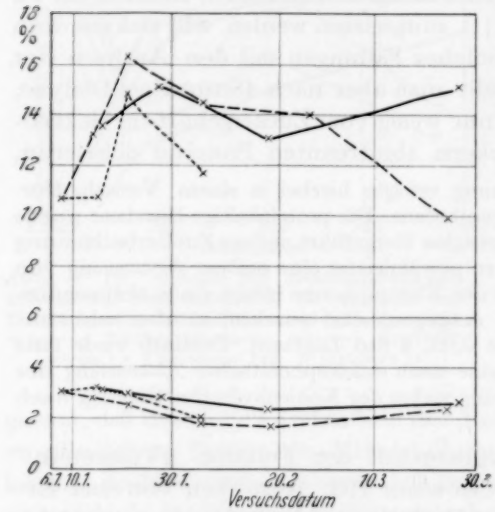


Abb. 10. Der Zuckergehalt der frostempfindlichen Fraktion (obere Kurven) und der löslichen Fraktion (untere Kurven) von Criewener 192 in Prozenten des Proteingewichtes. Zeichen wie Abb. 9

Bei den Proteinen der Fraktion P_2 treten stärkere Schwankungen im Zuckergehalt auf. Teilweise sind diese wohl darauf zurückzuführen, daß die Abtrennung der freien Zucker bei dieser Fraktion nicht so sauber vorgenommen werden konnte wie bei den anderen Bestimmungen. Die Fraktion P_2 ist ja durch Zentrifugieren vom (undialysierten) „Vollprotein" abgetrennt worden und dürfte trotz einer Waschung noch inkludierte Kohlenhydrate enthalten. So mag auch der höhere Kohlenhydratgehalt im Härtungsversuch zu erklären sein: Im frostharten Zustand stehen mehr Zucker als im nicht resistenten Zustand für das Mitgerissenwerden beim Zentrifugieren zur Verfügung.

Der Zuckergehalt der einzelnen Eiweißfraktionen der Sorte Hauter's II entsprach praktisch dem der Sorte Criewener. Nur in der Fraktion P_2 des Feldversuches wurden geringere Zuckermengen festgestellt, dafür im Kontrollversuch ein größerer Zuckeranteil.

Welche Zucker treten nun an Eiweiß gebunden auf? Nach Hydrolyse mit 1,5 n-H_2SO_4 wurden sowohl in der Fraktion P_2 als auch in der löslichen Fraktion Galaktose, Glucose und Arabinose, weniger Ribose, Xylose und Fructose gefunden. In Tabelle 4 ist das Ergebnis der Zuckerbestimmungen dargestellt. Die Zahlenangaben in Prozent beziehen sich auf die Summe der bestimmten Zucker.

Tabelle 4. *Das Verhältnis verschiedener Zucker am Gesamtzuckergehalt der frostempfindlichen und der löslichen Fraktion*

	Frostempfindliche Fraktion		Lösliche Fraktion	
	aus frostharten Blättern %	aus ungehärteten Blättern %	aus frostharten Blättern %	aus ungehärteten Blättern %
Glucose .	20,4	18,8	33,1	26,0
Galaktose	67,4	67,2	46,6	54,0
Arabinose	8,3	8,4	11,3	10,7
Xylose .	4,3	5,6	8,8	10,7

Auch hier ist kein wesentlicher Unterschied zwischen Härtungs- und Kontrollversuch festzustellen.

Das Vorkommen von Galaktose, Arabinose und Xylose im Proteinzucker ist recht erstaunlich. Es könnte hier die Vermutung auftauchen, daß diese Zucker gar nicht an Eiweiße gebunden waren, sondern aus Pektinstoffen oder Hemicellulosen freigesetzt worden sind, daß also die Abtrennung dieser Stoffe von den Eiweißen nur unvollständig gelungen ist. Dem widerspricht, daß diese Zuckeranteile *weder* durch Dialyse *noch* im elektrischen Feld abtrennbar sind. Würden sie aus Hemicellulosen stammen, müßten sie bei der Elektrophorese von den Eiweißen abgetrennt werden, da Hemicellulosen nicht wandern. Stammten sie aber aus Pektinen, die mit den Proteinen wandern könnten, müßten als Hydrolyseprodukte Uronsäuren oder wenigstens Aldobiuronsäuren gefaßt werden können. Das war jedoch nicht der Fall.

Um den interessanten Befund noch weiter zu sichern, wurden Chloroplasteneiweiße nach einem ganz anderen Verfahren isoliert und untersucht: Nach schnellem Einfrieren der Blätter auf —70° C und Gefriertrocknung isolierten wir Chloroplasten auf „trockenem" Wege (Heber 1957, Behrens und Thalacker 1957, Stocking 1959). Dabei sind die Möglichkeiten zur Artefaktbildung, wie sie beim Homogenisieren im wässrigen Milieu zweifellos gegeben sind, weitgehend ausgeschlossen: Im verwendeten organischen Homogenisationsmedium sind die hydrophilen Eiweiße und Zucker völlig unlöslich und müssen sich also bei der Trennungsoperation der morphologischen Zellbestandteile im gleichen Verteilungszustand wie in vivo befinden. Eine Möglichkeit der Artefaktbildung besteht also nur in der mechanischen Verunreinigung der isolierten Chloroplasten durch andere Zellbestandteile. Dies wurde bereits diskutiert (Heber 1959), doch ist es darüber hinaus auch unter der Voraussetzung einer Verunreinigung höchst unwahrscheinlich, daß eine solche sich in Anbetracht der völlig verschiedenen Isolierungsmethoden der Eiweiße aus wäßrigem und organischem Milieu auf denselben Stoff erstreckt.

Aus den isolierten Chloroplasten wurden die löslichen Bestandteile mit Wasser extrahiert, so daß nur die Gerüsteiweiße verblieben, die weitgehend der zentrifugierbaren frostempfindlichen Fraktion entsprechen dürften. Wie die Zucker-

bestimmung mit Anthron ergab, enthielten sie 8,4% Zucker. Wir hydrolysierten nun die Gerüsteiweißstoffe wie oben angegeben und bestimmten die einzelnen Zucker des Hydrolysates chromatographisch. Die freigelegten Zucker hatten im Durchschnitt mehrerer Bestimmungen folgende prozentuale Zusammensetzung:

29% Glucose + Galaktose,
30% Arabinose,
33% Xylose und
8% Ribose.

Von den im Gerüsteiweiß enthaltenen Zuckern (8,4%) konnten chromatographisch 7% wiedergefunden werden. Auch aus diesem Befund ergibt sich also recht zuverlässig, daß der z. T. hohe Zuckergehalt verschiedener Plasmaproteine kein Homogenisations-Artefakt darstellt.

Im übrigen scheint die Zuckerzusammensetzung einzelner Eiweißfraktionen keine sehr konstante Größe zu sein, da zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführte Zuckerbestimmungen abweichende Ergebnisse brachten.

Aus den obigen Befunden läßt sich in Übereinstimmung mit früher erhaltenen Ergebnissen (Ullrich und Heber 1958) schließen, daß Glykoproteide, d. h. Eiweiße mit chemisch gebundenen Zuckeranteilen, bei der Frostresistenz zumindest von Winterweizen keine Schutzrolle spielen. Der Zuckeranteil der löslichen Fraktion, in der ein schützendes Prinzip enthalten sein sollte, bleibt trotz der Schwankungen der Frostresistenz geradezu auffallend konstant. Im Gegenteil treten Glykoproteide bevorzugt in der frostempfindlichen Fraktion auf. Daraus ist die Vermutung abzuleiten, daß wenigstens gewisse Glykoproteide labiler sind als reine Proteide.

4. Gefrierversuche. Bereits Lidforss (1907) konstatierte, daß der Preßsaft durch Frost abgetöteter Blätter weniger Proteine enthielt als derjenige ungefrorener lebender Blätter. Er schloß daraus, daß der Frostschaden in einer Denaturierung von Eiweißen bestehen müsse. Später schlossen sich Fuchs (1935) und Ullrich und van Veen (1942) dieser Ansicht an. Ullrich und Heber (1957) konnten den Lidfors'schen Befund bestätigen und weiter wahrscheinlich machen, daß eine Denaturierung bestimmter Eiweiße beim Einfrieren oder spätestens unmittelbar beim Auftauen stattfindet, indem sie durch Frost abgetötete Blätter noch in gefrorenem Zustand einer Eiweißextraktion unterzogen und weniger Eiweiße extrahieren konnten als aus ungefrorenen Blättern. Daß das seinen Grund in einer Denaturierung bestimmter Proteine hat, läßt sich weiter daraus schließen, daß z. B. die Aktivität der Cytochromoxydase im Extrakt nach dem Einfrieren wesentlich geringer ist als vorher (Heber, bisher unveröffentlicht).

Wenn nun die Schädigung der Pflanze durch Frost in einer Denaturierung von Proteinen besteht, d. h. in einem Verlust der physiologischen Aktivität von Enzymen oder der nativen Struktur von Gerüsteiweißen, wie vermag die Pflanze dann diese Schädigung beim Resistenzerwerb zu verhindern?

Newton und Brown (1926, 1931), Mudra (1932) und Fuchs (1935) beobachteten an Preßsäften beim Einfrieren Frostfällungen, die bei Zusatz von Zuckern unterblieben. Kessler (1935) konnte jedoch diese Versuche nicht bestätigen und er schließt daraus, daß die bearbeiteten Preßsäfte bereits denaturiertes Protein enthielten.

Von erheblicher Bedeutung bei der Extraktion pflanzlicher Proteine ist die Einhaltung eines p_H-Wertes über 7,0, die durch Alkali-Zusatz erreicht werden kann, wie eingangs bereits angeführt wurde. Wesentliche Teile des Plasmaeiweißes von Weizenblättern fangen bereits bei einem p_H-Wert von etwa 6,7 an zu aggregieren und zu denaturieren. Der p_H-Wert des Kochsaftes, der ungefähr dem der Vacuole vergleichbar sein dürfte, liegt aber zwischen 5,2 und 6,0. So ist also unvermeidlich, daß wäßrige Homogenisate ohne Alkali- oder Puffer-Zusatz bzw. Preßsäfte von Blättern unkontrollierbare Mengen an nativem und sonst im wesentlichen bereits denaturiertes Protein enthalten müssen.

Scarth (1944) verneint daher die Möglichkeit, daß Zucker oder andere protektive Substanzen die Koagulation des Plasmas durch Frost in wesentlichem Maße hindern können. Dagegen zeigten Ullrich und Heber (1957, 1958), daß Zucker in erheblichem Maße stabilisierend auf frostempfindliche Plasmaeiweiße beim Gefrieren einwirken können. Es mußte nun interessieren, ob neben Zuckern und — wie sich später zeigte — Peptiden (Heber 1958b) auch Eiweiße eine denaturierungsverhindernde Wirkung entfalten können.

Die Prüfung wurde so vorgenommen, daß wir die zu untersuchenden Eiweiße in verschiedener Konzentration zu Lösungen des frostempfindlichen Proteins zugaben, wobei die Endkonzentration des empfindlichen Proteins im allgemeinen 1,5—2% betrug. Nach 24stündigem Gefrieren wurde durch Abzentrifugieren und Auswiegen die Menge des denaturierten Proteins bestimmt. Die Menge des in Lösung verbliebenen Eiweißes diente als Maß der Schutzwirkung.

Es ist nicht einfach, geeignete Eiweiße für einen Frostschutzversuch auszuwählen. Fremde Eiweiße üben aufeinander Wirkungen aus, die nicht ohne weiteres von vornherein überschaubar sind. So zeigte es sich beispielsweise, daß Lösungen von käuflichem Eieralbumin auf Plasmaeiweiße von Weizenpflanzen denaturierend und fällend wirken. Auch ist beim Vergleich mit dem in-vivo-Geschehen bei Verwendung blattfremder Eiweiße größte Vorsicht geboten. Deshalb war erst einmal das Verhalten der frostunempfindlichen löslichen Fraktion gegenüber der frostempfindlichen Fraktion im in-vitro-Gefrierversuch zu prüfen. Wir gewannen im Frühjahr 1957 und 1958 größere Mengen der löslichen Fraktion aus Pflanzenmaterial, dessen Frostresistenz bereits weitgehend verlorengegangen war, durch alkalische Extraktion der Blätter, anschließendes Abzentrifugieren erst der Zellwandbestandteile und dann der frostempfindlichen Fraktion und Vakuumdestillation sowie schließlich Dialyse der verbleibenden Eiweißlösung.

Extraktionsbeispiel: 250 g Blätter wurden in alkalischem Milieu homogenisiert und die Zellwandbestandteile entfernt. Die resultierende Lösung (etwa 1000 ml)

zentrifugierten wir bei 25000 g 2 Std, engten die überstehende braune Lösung auf etwa 100 ml im Vakuum bei 37° C ein, dialysierten 2 Tage gegen Phosphatpuffer (p_H 7,2, 0,05 molar), engten wieder ein auf etwa 35 ml und dialysierten wieder. Der Eiweißgehalt der resultierenden Lösung, aus der denaturierte Proteinanteile durch kurzes Zentrifugieren bei 4000 g abgetrennt wurden, betrug 12%.

Aus dieser Proteinlösung isolierten wir dann weiter einen Eiweißanteil, der Aussalzung mit Ammoniumsulfat vertrug, d. h. sich nach dem Aussalzen wieder klar löste. Sowohl die lösliche Fraktion als auch die daraus gewonnene Ammonsulfat-Unterfraktion zeigten in den geprüften Konzentrationen keine denaturierungsverhindernde Wirkung im Frostschutzversuch, wie aus Tabelle 5 zu ersehen ist. Zum Vergleich ist die

Tabelle 5. *Die Wirkung der löslichen Fraktion und einer aus ihr hergestellten Ammonsulfat-Unterfraktion auf die frostempfindlichen Eiweiße im Vergleich zur Wirkung von Glucose beim Einfrieren auf —20° C*

Konzentration an zugesetzter, auf Frostschutzwirkung zu prüfender Substanz	1%	2%	3%	4%
Denaturiertes Protein in Prozenten des frostempfindlichen Proteins bei Zusatz von				
Glucose	92	73	25	13,5
Proteinen der löslichen Fraktion	96	109	124	140
Proteinen der Ammonsulfat-Fraktion	97	109	120	143

Die Frostfällung der empfindlichen Eiweiße ohne Schutzstoffzusatz wurde gleich 100 gesetzt (100% übersteigende Werte an ausgefälltem Protein erklären sich aus einem Mitreißen der zugesetzten Schutzstoffe).

Schutzwirkung von Glucose mit angegeben. Im Gegenteil ist festzustellen, daß die ausfallenden Proteine der frostempfindlichen Fraktion noch einen erheblichen Teil der zugesetzten, selbst frostunempfindlichen Proteine mitzureißen vermögen. So erklären sich die erheblich über der Kontrolle liegenden Fällungswerte bei Zusatz von Eiweißen der frostunempfindlichen Fraktion.

Diese Versuche wurden im Januar 1959 nochmals wiederholt, wobei im Gegensatz zu den früheren Versuchen die lösliche Eiweißfraktion aus frostresistentem Feldmaterial gewonnen wurde. Um einen Schutzeffekt stärker hervortreten zu lassen, untersuchten wir die Wirkung der löslichen Eiweiße nicht auf die abgetrennte frostempfindliche Fraktion, sondern auf eine 0,35%ige Lösung des „Vollprotein" (Abb. 11). Tatsächlich zeigte sich in diesem Falle eine Schutzwirkung, allerdings erst bei höherer Konzentration an zugesetztem löslichem Protein. Bei niedriger Konzentration (unter 4%) war offenbar der Einfluß der schutzwirksamen Proteine so gering, daß noch beträchtliche Mengen an Eiweiß aus dem zugesetzten Schutzanteil bei der Frostfällung des „Vollprotein" mitgerissen wurden. So ist zu erklären, daß die Menge des beim Gefrieren ausgefällten Eiweißes anfänglich mit der Konzentration an

zugesetztem löslichen Protein ansteigt, um dann nach Erreichen einer bestimmten Schutzkonzentration abzufallen. Wie aus Abb. 11 weiter hervorgeht, hat die zum Vergleich untersuchte Glucose eine beträchtlich bessere Schutzwirkung als die lösliche Eiweißfraktion. Das kann jedoch nicht besagen, daß Zucker unbedingt besser als irgendwelche zur Schutzwirkung befähigten Proteine die Frostfällung des empfindlichen Proteins verhindern. So können bestimmte blattfremde Proteine wie Rinderserumeiweiße eine durchaus beachtliche

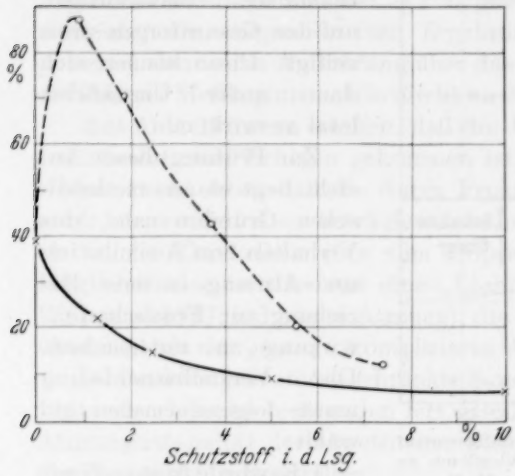


Abb. 11

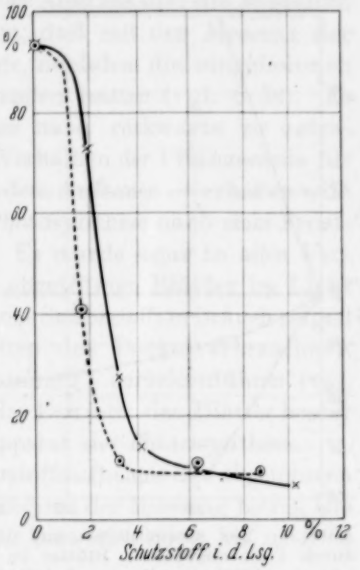


Abb. 12

Abb. 11. Der Schutzeffekt von Eiweißen der löslichen Fraktion im Vergleich zu dem von Glucose auf eine 0,35 %ige Lösung des „Vollproteins". Ordinate: Durch Gefrieren bei —20° C coaguliertes Eiweiß in Prozenten des „Vollprotein"-Eiweißes. Abszisse: Schutzstoffgehalt in Prozenten der Lösung. ×——× Glucose, ○– – –○ Eiweiß der löslichen Fraktion

Abb. 12. Der Schutzeffekt von Rinderserum im Vergleich zu dem von Glucose auf eine 1,5 %ige Lösung des frostempfindlichen Proteins. Ordinate: Durch Gefrieren bei —20° C denaturiertes Eiweiß in Prozenten des frostempfindlichen Proteins. Abszisse: Schutzstoffgehalt in Prozenten der Lösung. ×——× Glucose, ○– – –○ Rinderserumeiweiß

Schutzwirkung erzielen, die die der Zucker sogar noch übersteigt (Abb. 12). Das verwandte Rinderserum enthielt 38% Albumine und 62% Globuline. Dies ging aus der elektrophoretischen Untersuchung hervor. Es wurde aus Rinderblut gewonnen, durch Vakuumdestillation konzentriert und durch Dialyse gereinigt.

Aus den Modellversuchen läßt sich also schließen, daß auch Eiweiße schützend gegen eine Frostdenaturierung anderer empfindlicher Proteine wirken können. Offenbar ist wenigstens während der Zeit der Frostresistenz in der löslichen Eiweißfraktion der Weizenblätter ein Proteinanteil enthalten, der Schutzwirksamkeit besitzt. Aus Untersuchungen an isolierten Chloroplasten geht ebenfalls hervor, daß neben Zuckern auch

Proteine als Schutzstoffe an der Frosthärtung beteiligt sein müssen (HEBER 1959).

5. Gaswechseluntersuchungen an Blättern. Aus den Untersuchungen über die Frostempfindlichkeit verschiedener Plasmaproteine (s. S. 40) ließ sich die Ansicht herleiten, daß möglicherweise gar nicht die Zelle als Gesamtorganismus primär frostempfindlich ist, sondern daß vermutlich nur besonders frostempfindliche Bereiche in der Zelle existieren, deren Schädigung sekundäre Auswirkungen auf den Gesamtorganismus zeitigt. Diese können sich dann unter Umständen letal auswirken.

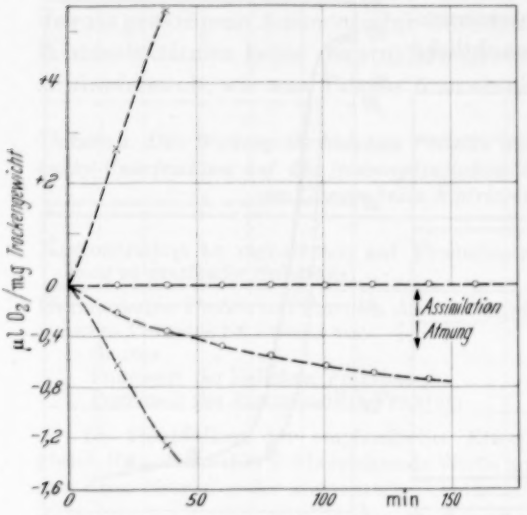


Abb. 13. Der Assimilations- und Atmungsverlauf durch Frost abgetöteter Blätter im Vergleich zu lebenden Blättern. Messung bei 25° C. Meßbeginn 2 Std nach Entnahme der Blätter aus der Kältekammer. Abszisse: Zeit nach Meßbeginn. Positive Ordinate: Effektive Assimilation in μl O_2/mg Trockensubstanz. Negative Ordinate in anderem Maßstab: Atmung in μl O_2/mg Trockensubstanz. ○ Tote Blätter, × lebende Blätter

Zur Prüfung dieser Ansicht liegt es aus methodischen Gründen nahe, das Verhalten von Assimilation und Atmung in ihrer Beziehung zur Frostschadenwirkung zu untersuchen. Die Versuchsanordnung wurde folgendermaßen gewählt:

1. Es wurde *frostempfindliches* Material auf —12° C (bzw. bei einigen anderen Versuchen auf andere Temperaturen, die in relativ schonender Weise eine Frostschadenswirkung gewährleisteten) gebracht, wobei Frosttod eintrat. Das tote turgorlose Blattmaterial wurde untersucht.

2. Es wurde *frostresistentes* Pflanzenmaterial auf —20° C gebracht. An den toten turgorlosen Blättern wurden Messungen vorgenommen.

3. Es wurde *frostresistentes* Pflanzenmaterial auf —12° C gebracht. Dabei trat ein Steiffrieren der Blätter ein. Nach dem Auftauen waren die Pflanzen turgorlos, erholten sich aber innerhalb von etwa $2^1/_2$—3 Std wieder (also während des Verlaufes der Messung).

4. Zum Vergleich wurde *frostresistentes* und *frostempfindliches* Pflanzenmaterial, das bei + 2° C gestanden hatte, untersucht.

Abb. 13 gibt Verhältnisse wieder, wie sie nach Einfrieren auf Temperaturen zu beobachten sind, bei denen Frosttod eintritt. In der positiven Ordinatenrichtung ist die effektive Assimilation in μl O_2/mg trockene

Blattsubstanz aufgetragen. Sie wurde erhalten durch Addition der apparenten Assimilationswerte, die in der Lichtperiode beobachtet werden, und der Atmung, die in der Dunkelperiode gemessen wird. Aus der Atmungsgröße in der Dunkelperiode wurde auf eine entsprechende Größe in der Lichtperiode geschlossen. Ob das zulässig oder anfechtbar ist, sei zunächst nicht erörtert. Die negative Ordinate gibt die Atmung ebenfalls in μl O_2/mg Trockensubstanz wieder. Auf der Abszisse sind die Meßzeiten in Minuten aufgetragen. Zu beachten ist, daß mit der Messung der Atmung und Assimilation begonnen wurde, nachdem die eingefrorenen Pflanzenteile einige Zeit bei $+2^0$ C gestanden hatten (vgl. S. 38). Es sind also die aufgezeichneten Ergebnisse nach rückwärts zu extrapolieren, wenn man Aufklärung über das Verhalten der Pflanzenteile für die Zeit vor Meßbeginn — also direkt nach dem Auftauen — erhalten will.

Aus Abb. 13 ist zu ersehen, daß die Photosynthese nach dem Frosttod absolut zum Erliegen gekommen ist. Es wurde sogar in allen Versuchen beobachtet, daß die durch Frost abgetöteten Blätter im Licht noch kürzere Zeit einen beträchtlich höheren Sauerstoffverbrauch zeigen als in der Dunkelheit (bis zum Doppelten des Dunkelverbrauches): Möglicherweise ist dies auf eine „Lichtatmung" zurückzuführen (vgl. WARBURG 1957, induzierte Atmung), die das Erfrieren der Blätter besser übersteht als der gesamte komplizierte Apparat der Photosynthese.

Im Dunkeln geht eine beschränkte Sauerstoffaufnahme der abgetöteten Blätter noch mehrere Stunden fort. Bei Beginn der Messung betrug die Atmungsintensität der abgetöteten Blätter bisweilen noch bis zu 40% der der intakten Kontrollen.

Die absolute Höhe der „Restatmung" schwankt bei verschiedenen Proben beträchtlich, beträgt aber etwa 2 Std nach Beginn des Auftauens selten weniger als 20% der intakten Atmung. Im übrigen zeigen frostresistentes und frostempfindliches Material keine prinzipiellen Unterschiede in der O_2-Aufnahme.

Natürlich konnte die nach dem Tod der Pflanze beobachtete Sauerstoffaufnahme auch andere Ursachen haben als das eigentliche Atmungsgeschehen. So könnte eine vermehrte Sauerstoffaufnahme infolge einer durch den Tod verstärkten unkontrollierten Lipoxydasewirkung auftreten. Ein klarer Beweis, daß die Sauerstoffaufnahme auf Atmungsvorgänge zurückgeht, läßt sich mittels der manometrischen Methode nicht führen. Wenn jedoch eine der Sauerstoffaufnahme entsprechende CO_2-Abscheidung zu beobachten ist, dürfte dies ein deutlicher Hinweis auf einen geregelten Atmungsvorgang sein.

Berechnungen des Respirationsquotienten intakter, ungefrorener Blätter ergaben erwartungsgemäß R_Q-Werte zwischen 0,95 und 1,0. Die Restatmung durch scharfes Frosten abgetöteter, aber ursprünglich frostresistenter Pflanzen wies meist etwas höhere R_Q-Werte auf: sie lagen

zwischen 0,9 und 1,7. Erstaunlicherweise wichen die R_Q-Werte frosttoter, ursprünglich frostempfindlicher Pflanzen von denen der resistenten abgetöteten Pflanzen ab: Hier waren Werte zwischen 2 und 6 zu beobachten. Jedenfalls geht aus den Befunden hervor, daß die Sauerstoffaufnahme von einer CO_2-Abgabe begleitet war und somit noch geregelte Atmungsvorgänge abliefen. Der Anstieg der R_Q-Werte beim Frosttod ist möglicherweise auf eine bevorzugte Frostdenaturierung der partikulär gebundenen Cytochromoxydase zurückzuführen: Die Decarboxylierungs-

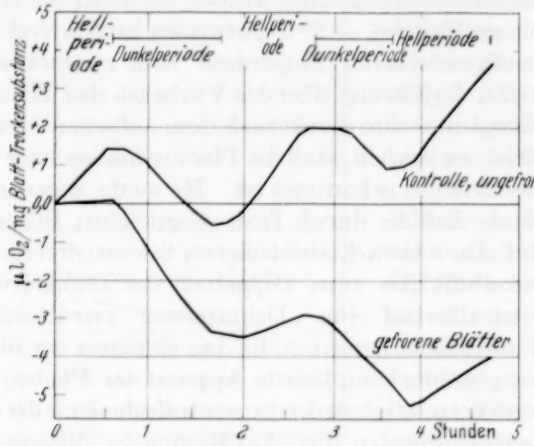


Abb. 14. Schwankungen der Sauerstoffabgabe und -aufnahme von Blättern, die ein Gefrieren überstanden, im Hellen und Dunkeln im Vergleich zu ungefrorenen Blättern. Kurvenanstieg: Überwiegen der Assimilation über die Atmung im Hellen, Kurvenabstieg: Atmung im Dunkeln

reaktionen der Atmung laufen zwar noch ab, doch ist die Sauerstoffaufnahme teilweise gehemmt.

Wie verhalten sich nun Assimilation und Atmung, wenn der Eingriff des Einfrierens nicht zum Frosttod führt?

In Abb. 14 sind Ergebnisse eines repräsentativen Warburg-Versuches dargestellt, in dem die Schwankungen des O_2-Partialdruckes im Verlaufe von Hell- und Dunkelperioden gemessen wurden. In den Warburg-Gefäßen befanden sich Blätter, die ein Steiffrieren bei $-12°$ C überstanden hatten, bzw. ungefrorene Kontrollen.

Die gefrorenen Blätter waren nach dem Auftauen anfangs völlig turgorlos, wurden aber im Verlaufe von $2^1/_2$—3 Std wieder turgescent. In den Dunkelperioden ist sowohl bei den Kontrollen als auch bei den gefrorenen Pflanzen ein starker Sauerstoffverbrauch zu beobachten, während in den Hellperioden die Sauerstoffabgabe bei gefrorenem Material anfangs nahezu Null war, um erst im Verlaufe des Versuches stärker anzusteigen. Bei den Kontrollen war der Sauerstoffausstoß in den Hell-

perioden während des ganzen Versuches konstant. Abb. 15 zeigt weitere Assimilations- und Atmungswerte im Durchschnitt mehrerer Versuche. Gegenüber den Kontrollen sind die Netto-Assimilationswerte der gefrorenen Blätter außerordentlich stark herabgedrückt. Während der Messung stieg die Assimilation zwar an, erreichte aber die Höhe der Kontrolle bei weitem noch nicht, als die Blätter schon wieder völlig turgescent waren. Durch Steiffrieren der Blätter wird also das Assimilationssystem weitgehend inaktiviert, wenn nicht gar geschädigt.

Mit diesen Feststellungen können wir Befunde von TRANQUILINI (1957) sowie PISEK und WINKLER (1958) auch auf Getreide erweitern, die fanden, daß alpine Nadelhölzer nach Tagen mit starkem Frost erheblich weniger assimilierten als in frostfreien Perioden.

Daß zur Beurteilung der Zeit vor Meßbeginn bis zum Beginn des Auftauens der Blätter die Kurven nach rückwärts extrapoliert werden müssen, gilt für Abb. 15 ebenso wie für Abb. 13.

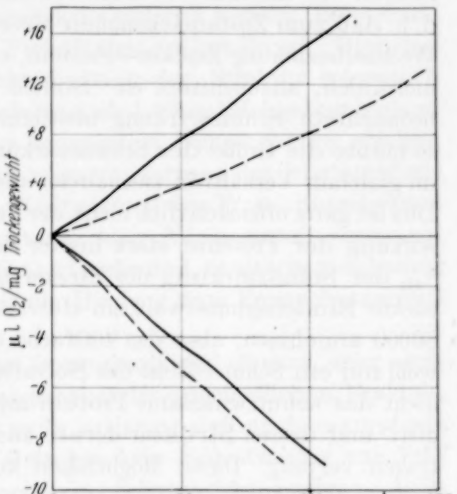


Abb. 15. Der Assimilations- und Atmungsverlauf von Blättern, die den Gefriervorgang überlebten, gegenüber den Kontrollen. Messung bei 25° C. Meßbeginn 2 Std nach Entnahme aus der Kältekammer. Abszisse und Ordinate wie in Abb. 13. ——— Kontrolle, – – – – gefrorenes Material

Die Atmung war meist zu Beginn der Messung beträchtlich erhöht, um mit dem Turgescent-Werden der Blätter oder bald danach wieder etwa auf den Stand der Kontrollen zu sinken. Die gefrorenen Blätter wiesen überraschenderweise höhere R_{ϑ}-Werte auf als die Kontrollen: 1,05 bis 1,20 gegenüber 0,95—1,0.

Aus all diesen Ergebnissen geht eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Assimilations- und der Atmungs-Zentren gegenüber der Frostwirkung hervor. Die Assimilation wird durch die Frostwirkung außerordentlich leicht in Mitleidenschaft gezogen, während die Atmung offenbar resistenter ist. Wenn man vorsichtig verallgemeinert, scheinen die erhaltenen Ergebnisse die Ansicht zu stützen, daß verschiedene Bereiche der Zelle sehr unterschiedliche Frostempfindlichkeit besitzen.

Besprechung der Ergebnisse

1. Der Mechanismus der Frostschutzwirkung von Proteinen. Auf welche Weise kommt eine beobachtete Schutzwirkung bestimmter

Proteine gegenüber einer Frostfällung empfindlicher Plasmaeiweiße zustande? Bezüglich des Schutzeffektes der Zucker auf die frostempfindliche Eiweißfraktion haben Ullrich und Heber (1958) sowie Heber (1958a) die Problematik der Wirkungsweise bereits behandelt. Auf Grund der unterschiedlichen Schutzwirksamkeit von Zuckern verschiedenen Molekulargewichtes sowie auf Grund von rechnerischen Überlegungen gelangten sie zu der Ansicht, daß zumindest bei tiefen Temperaturen ein molekularer Mechanismus der Schutzwirkung vorherrscht, d. h. daß zum Zustandekommen einer Schutzwirkung eine unmittelbare Wechselbeziehung Zucker—Protein, evtl. über die Brücke von Wassermolekülen, anzunehmen ist. Sollten gleiche Verhältnisse auch für die beobachtete Schutzwirkung bestimmter Proteine und Peptide gelten, so müßte die Größe der Schutzwirkung dieser Stoffe zu der der Zucker im gleichen Verhältnis zueinander stehen wie deren Molekulargewichte. Dies ist ganz offensichtlich nicht der Fall, denn es müßte dann die Schutzwirkung der Proteine stark hinter der der Zucker zurücktreten, etwa $^1/_{400}$ der Schutzwirkung der Zucker betragen, wenn wir für das untersuchte Rinderserumeiweiß ein durchschnittliches Molekulargewicht von 80000 annehmen, also das 400fache der Glucose. Es kommt hier also wohl nur ein Schutzeffekt des Solvatwassers der Eiweiße in Frage, wenn nicht das schutzwirksame Protein mit dem empfindlichen Protein reagiert und dessen Struktur derart ändert, daß es ein Einfrieren zu ertragen vermag. Diese Möglichkeit konnte aber durch Zentrifugierversuche sowie durch elektrophoretische Untersuchungen weitgehend ausgeschlossen werden: Auch nach Zusatz von Rinderserum bleibt die frostempfindliche Fraktion bei 25000 g auszentrifugierbar. Es hat also wohl keine wesentliche Änderung des Teilchengewichtes stattgefunden. Weiter wandern die Eiweiße des Serums und der frostempfindlichen Fraktion unbeeinflußt voneinander im elektrischen Feld, so daß angenommen werden muß, daß eine Einflußnahme des Serumproteins auf das empfindliche Protein unter Änderung von dessen Struktur nicht stattgefunden hat.

Wie ist es nun zu erklären, daß ein Protein mit seinem Solvatwasser ein anderes Protein zu stabilisieren vermag, das an sich auch hydratisiert ist, ja hydratisiert sein muß, um nativ zu bleiben? Offenbar muß hier *ein* Protein, nämlich das unempfindliche, seinen strukturwichtigen Hydratanteil wesentlich fester binden als das andere. Beim Protein ist ein geringer Anteil des Wassers (größenordnungsmäßig 0,04 g/g Protein; vgl. Edsall 1953, Buchanan und Mitarbeiter 1952) mit 3—6 kcal pro Mol über dem Energieniveau des Wassers gebunden, ein weiterer Anteil mit einem geringeren Energiebetrag. Größenordnungsmäßig macht das Coulombsche Gesetz über die Höhe dieses Anteiles eine Aussage, wonach die auf die Wassermoleküle bindend wirkende Kraft mit der 3.—4. Potenz des Abstandes abfällt. So läßt sich rein qualitativ schon sagen, daß der

so gebundene Wasseranteil nicht groß sein kann. Es kann nun das Wasser ausfrieren, das mit einem kleineren Energiebetrag gebunden ist als etwa 1,4 kcal/Mol, d. h. der Energiemenge, die beim Übergang des Wassers in den Gitterverband des Eises frei wird. Beim frostschützenden Eiweiß ist nur das fester gebundene Wasser wesentlich zur Aufrechterhaltung der inneren Struktur des Proteinmoleküls, was sich eben dadurch manifestiert, daß dieses durch Frostwirkung nicht aggregiert werden kann. Darüber hinausgehende Wasseranteile können ohne Änderung der Eigenschaften des Proteinmoleküls entfernt werden. Beim frostempfindlichen Eiweiß dürften die Verhältnisse anders liegen. Hier sind Wasseranteile, die für die Aufrechterhaltung der Struktur wesentlich sind, mit einem geringeren Energiebetrag als 1,4 kcal/Mol gebunden und also ausfrierbar, worauf dann unter Aggregation Denaturierung erfolgen kann. Ist aber Frostschutz-Eiweiß zugegen, vermag das frostempfindliche Protein am fester gebundenen Hydratanteil des Frostschutzeiweißes so zu partizipieren, daß der strukturwichtige Wasseranteil sozusagen vom Frostschutzeiweiß zur Verfügung gestellt und natürlich gleichzeitig am Ausfrieren gehindert wird, da ja die Bindung zum Frostschutzeiweiß erhalten bleibt.

Nun gibt es Proteine, die selbst frostunempfindlich sind, aber auch keine schützenden Eigenschaften gegenüber der empfindlichen Fraktion entfalten. Das ist möglicherweise so zu erklären, daß sie dem empfindlichen Protein aus strukturellen Gründen kein Solvatwasser zur Verfügung stellen können und somit auch keine Schutzwirkung zeigen. Auch für die in ihrer Auswirkung grundsätzlichen Unterschiede im Hydratisierungsverhalten von Frostschutzeiweiß und frostempfindlichem Protein dürften Aufbau und Struktur eine wesentliche Rolle spielen. In diesem Zusammenhang interessiert, daß die frostempfindlichen Proteine neben Anteilen chemisch gebundenen Zuckers erhebliche Mengen an Lipoiden enthalten. Stoll und Wiedemann (1952) geben für Chloroplastin einen Lipoidgehalt von 30% an. An diesem hohen Gehalt an hydrophober Substanz dürfte es liegen, daß diese Proteine einem Wasserentzug besonders stark ausgesetzt sind.

Die Wirkungsweise von Proteinen als Schutzsubstanzen gegenüber anderen, empfindlichen Proteinen fügt sich also gut in das Bild ein, das die Kolloidtheorie (vgl. Andersson 1944) von der Frostresistenz zeichnet, wobei jetzt auch eine ins einzelnere gehende Hypothese über die Art der Schutzwirkung entwickelt werden kann.

2. Erörterung der Bedeutung der Eiweiße für die Frostresistenz. Eine positive Relation zwischen Eiweißgehalt und Frostresistenz fanden Newton (1924), Christoff (1939), Bula und Mitarbeiter (1956) sowie Hodgson und Bula (1956) und Mirimanjan (1957), doch kamen Sattler (1929), Wilhelm (1935), Carroll und Welton (1939) sowie Sakai (1958)

zu entgegengesetzten Ergebnissen. Das erscheint insofern etwas verwunderlich, als ja die Kolloidtheorie die ganz allgemein gehaltene Forderung stellt, daß hydrophile Kolloide das Wasserbindungsvermögen des Plasmas erhöhen sollen. Diese Forderung wird am ehesten erfüllt durch eine Erhöhung der Menge an hydrophilen Kolloiden, als welche — zumindest bei Winterweizen — im wesentlichen nur Eiweißkörper in Frage kommen.

Neuerdings fanden Siminovitch und Briggs (1949, 1953) bei der Robinie, Henze (1959) bei Obstgehölzen eine Parallelität zwischen Frostresistenz und Gehalt an „löslichen" Proteinen. Auch Sakai (1957) beobachtet solche Beziehungen beim Maulbeerbaum, doch steigt der Gehalt an löslichem Protein bereits vor Beginn des Resistenzerwerbes an und sinkt erst nach Verlust der Resistenz ab. Bei der künstlichen Frosthärtung kann Sakai ebenso wie wir keinen Einfluß des Gehaltes an löslichen Proteinen auf die Resistenz feststellen (1958). Levitt (1954) fand bei der Kartoffel einen Anstieg des löslichen Proteingehaltes bei niedriger Temperatur, ohne daß jedoch diese überhaupt die Befähigung zum Resistenzerwerb besitzt. Dies alles läßt Zweifel daran aufkommen, daß ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Gehalt an löslichen Proteinen und Frostresistenz besteht.

Dazu kommt noch, daß gegen das Extraktionsverfahren von Siminovitch und Briggs wesentliche Einwände zu erheben sind: In der ausdifferenzierten Pflanzenzelle umgibt das Plasma eine Vacuole, die meist sauren Zellsaft enthält. Beim Homogenisieren mit Wasser, wie es Siminovitch und Briggs durchführen, kommen Plasma und saurer Zellsaft in Berührung, wobei Säurefällung und -denaturierung eines erheblichen Teiles der Plasmaeiweiße erfolgt (Singer und Mitarbeiter 1952), sofern nicht durch geeignete Maßnahmen (Pufferung oder Alkaliextraktion) die Säure des Zellsaftes abgestumpft wird. Nun ist bekannt, daß der p_H-Wert des Zellsaftes beim Erwerb der Frostresistenz ansteigt (Dexter 1935, Kessler 1935, Constantinescu 1933, eigene Untersuchungen an Weizen). Daraus folgt, daß im frostresistenten Zustand beim Vermischen von Plasma und Vacuole weniger Protein säuredenaturiert wird als im empfindlichen Zustand. Es ist also sehr wohl möglich, den von Siminovitch und Briggs erhaltenen Befund ganz einfach so zu erklären, daß mit abnehmender Acidität des Zellsaftes weniger Eiweiße säuredenaturiert werden und deshalb mehr im Extrakt erscheinen. Wenn dieser Einwand richtig ist, kann aus den Befunden dieser Autoren über eine echte Akkumulation an löslichen Proteinen gar nichts ausgesagt werden.

In den eigenen Untersuchungen wurde gefunden, daß bei der Härtung im kalten Winter 1956, bei der hohe Resistenzgrade erreicht wurden, eine starke Proteinsynthese erfolgte, während im warmen Winter 1957 die

Verhältnisse weniger übersichtlich waren. Fraglich bleibt, ob nicht eine Proteinzunahme im Verlaufe der Härtung eine einfache Folge der luxurierenden Kohlenhydratstoffwechsel ist. Die Proteinsynthese steht ja letztlich mit dem Zuckerstoffwechsel im Zusammenhang, und Zucker werden im Verlaufe des Resistenzerwerbes reichlich zur Verfügung gestellt.

Die Frage läßt sich natürlich nicht so einfach entscheiden. Es sei jedoch daran erinnert, daß während der Härtung auch eine absolute Zunahme von Aminosäuren (Heber 1958b) und in geringfügiger Weise von Hemicellulosen (Heber 1958a) in der Zellwand festgestellt wurde, ohne daß offensichtlich eine Beziehung zur Frostresistenz besteht.

Aus all dem könnte man den Schluß ziehen, daß die Bedeutung von Proteinen für die Frostresistenz gegenüber der der Zucker als Schutzstoffe zurücksteht. Diese Folgerung erscheint verfrüht aus mehreren Gründen:

Wenigstens bei frostresistentem Pflanzenmaterial ist die lösliche Fraktion der Eiweiße in der Lage, die Frostfällung des empfindlichen Proteins zu verhindern. Der Gehalt dieser Fraktion an schutzwirksamem Protein ist allerdings wohl nicht groß, da dem frostempfindlichen Protein beträchtliche Mengen an Eiweiß der löslichen Fraktion zuzusetzen sind, ehe eine wesentliche Schutzwirkung resultiert. Daß Proteine eine hohe Schutzwirkung entfalten können, zeigt das Verhalten von blattfremden Serumeiweißen im Schutzversuch.

Vergleicht man die Schutzwirkung der Zucker mit der der löslichen Eiweißfraktion, so ist ein wesentlich stärkerer Schutzeffekt bei den Zuckern (Bezugnahme auf die Gewichtseinheit) festzustellen. Trotzdem kann in vivo die Bedeutung der Eiweiße als Schutzstoffe durchaus groß sein: Zucker kommen sowohl im Plasma als auch in der Vacuole vor, und auch dann, wenn sie im Verlaufe des Resistenzerwerbs im Plasma gespeichert werden, fällt ein erheblicher Teil des analytisch gefundenen Zuckers — nämlich der in der Vacuole befindliche Teil — für eine direkte Schutzwirkung aus, da ja Zucker wie auch Proteine nur in direktem Kontakt mit den zu schützenden Eiweißen wirksam sein können. Die Proteine sind demgegenüber zum ganz überwiegenden Teil im Plasma lokalisiert, so daß auch bei einer gegenüber dem Zuckergehalt zurücktretenden Menge an schutzwirksamen Protein ein wesentlicher Schutzeffekt resultieren kann.

Weiter weist der Gehalt an löslichen Eiweißen in den Chloroplasten Parallelen zur Frostresistenz auf, wie aus anderen Untersuchungen hervorgeht (Heber 1959). Auch dies ist ein Hinweis darauf, daß Eiweiße als Schutzstoffe eine nicht unwesentliche Rolle bei der Frostresistenz spielen.

In neuerer Zeit wird mehrfach die Ansicht vertreten, daß Glykoproteide am Resistenzerwerb ganz wesentlich beteiligt seien (Tonzig

1937, 1941, Jeremias 1956, Henze 1959). Die Befunde von Jeremias wurden bereits diskutiert. Henze fand in der Rinde von Obstgehölzen eine starke Erhöhung des Glykoproteidgehaltes im Winter und schließt daraus auf deren direkte Beteiligung am Resistenzerwerb. Er berücksichtigt jedoch nicht, daß eine Erhöhung des Glykoproteidgehaltes wie eine solche des gesamten Eiweißspiegels und ein Absinken im Frühjahr bei sommergrünen Pflanzen ohne weiteres zu erwarten ist. Im Herbst muß ja mit der Rückführung von Stoffen aus den Blättern der Spiegel an translozierbaren Stoffen in der Rinde ansteigen und im Frühjahr mit der Mobilisierung von Reservestoffen absinken, ohne daß daraus notwendig auf ursächliche Beziehungen zur Resistenz zu schließen ist. Gegenüber den Befunden der angeführten Autoren fanden wir in der frostempfindlichen Fraktion einen Gehalt an gebundenen Zuckern von etwa 12%, während die frostunempfindliche lösliche Eiweißfraktion nur etwa 3% gebundene Zucker enthielt. Also ist der Glykoproteidgehalt der *frostempfindlichen* Fraktion wesentlich *höher* als derjenige der *löslichen* Fraktion, in der schutzwirksame Proteine zu suchen sind. Zudem war vor allem in der löslichen Fraktion der Zuckergehalt der Eiweiße im Härtungsversuch und im Kontrollversuch gleich und wies keinerlei Gang mit der Frostresistenz auf. Das alles besagt, daß Glykoproteide zum mindesten bei Winterweizen als spezifische Schutzstoffe nicht in Frage kommen. Diese Ansicht steht auch in Übereinstimmung mit Befunden Levitts (1954a) bei Kohl.

Die Bedeutung der frostempfindlichen Fraktion liegt unserer Ansicht nach darin, daß sie sozusagen als Schadensträger bei der Frostwirkung anzusehen ist. Ein Schaden durch Frost an Eiweißen dieser Fraktion kann nun durch Ausbildung von Schutzstoffen und geeignete Lokalisation derselben von der lebenden Zelle verhindert oder durch Restitutionsvorgänge repariert werden.

Zusammenfassung

1. Im Modellversuch zeigte es sich, daß nur ein bestimmter Teil der Plasmaeiweiße durch Einfrieren bei tiefen Temperaturen coagulierbar ist. Dieser Teil umfaßt wahrscheinlich die Gesamtheit der hochorganisierten Proteineinheiten der Zelle, darunter alle grün gefärbten Proteide.

2. Verschiedene Weizensorten enthielten Mengen an frostempfindlichem Protein, deren Abstufung der der natürlichen Frosthärte dieser Sorten umgekehrt proportional waren.

3. Untersuchungen an den gebundenen Zuckern der frostempfindlichen und -unempfindlichen Eiweißfraktionen ergaben, daß wesentliche Unterschiede zwischen frostresistenten und frostempfindlichen Pflanzen nicht bestehen. Weiter wiesen die Proteine der frostempfindlichen Eiweißfraktion weitaus höhere Zuckergehalte auf als diejenigen der frost-

unempfindlichen Fraktion. Daraus geht einmal hervor, daß Glykoproteide bei der Frosthärtung keine Rolle als Schutzstoffe spielen, weiter aber auch, daß sie offenbar sogar labiler, frostempfindlicher sein können als reine Proteine. Die Frage, ob der in der frostempfindlichen Fraktion gefundene Zucker teilweise aus Verunreinigungen stammen kann, wird diskutiert.

4. Die Proteine des frostunempfindlichen, löslichen Eiweißanteiles sind im Frostschutzversuch in der Lage, die Fällung der empfindlichen Eiweiße durch das Einfrieren zu verhindern. Die Schutzwirkung der löslichen Fraktion ist allerdings nicht sehr groß und steht hinter der von Rinderserumeiweißen zurück, ebenso hinter der der Zucker.

5. Das Assimilationssystem der Pflanze ist weitaus frostempfindlicher als das Atmungssystem.

6. Die Schutzwirkung bestimmter Proteine wird über deren Wasserbindungsvermögen theoretisch zu erklären versucht. Es wird dazu angenommen, daß diese Proteine ihr Solvatwasser partiell auch den frostempfindlichen Eiweißen zur Verfügung zu stellen vermögen und so deren Coagulation verhindern können.

7. Das Für und Wider einer Beteiligung bestimmter schützender Eiweiße am Erwerb der Frostresistenz wird an Hand der bisherigen Befunde erörtert.

Herrn Prof. Dr. Ullrich möchte ich für seine verständnisvolle Unterstützung der Arbeit und eingehende Diskussionen besonders danken. Ebenso sei der Deutschen Forschungsgemeinschaft gedankt, die durch eine Sachbeihilfe die Untersuchungen erst ermöglichte. Unserem Institutsmechaniker, Herrn Brustkern, gebührt Dank für den Bau zweier Transformatoren mit Gleichrichter für die Elektrophorese sowie für seine geschickte technische Hilfeleistung überall dort, wo apparative Fragen auftauchten.

Literatur

Andersson, G.: Gas change and frost hardening studies in winter cereals. Lund 1955. — Anson, M. L.: Lyubimenko extracts of chlorophyll-protein. Science **93**, 186—187 (1941). — Armstrong, S. H., M. J. E. Budka and K. C. Morrison: Preparation and properties of serum and plasma proteins. XI. Quantitative interpretation of electrophoretic schlieren diagrams of normal human plasma proteins. J. Amer. chem. Soc. **69**, 416—429 (1947). — Armstrong, S. H., M. J. E. Budka, K. C. Morrison and M. Hasson: Preparation and properties of serum and plasma proteins. XII. The refractive properties of the proteins of human plasma and certain purified fractions. J. Amer. chem. Soc. **69**, 1747—1753 (1947). — Behrens, M., u. R. Thalacker: Gewinnung von Chloroplasten im nichtwässrigen Milieu. Naturwiss. **44**, 621 (1957). — Buchanan, T. J., G. H. Haggis, J. B. Hasted and G. B. Robinson: The dielectric estimation of protein hydration. Proc. roy. Soc. A **213**, 379—391 (1952). — Bula, R. J., D. Smith and H. J. Hodgson: Cold resistance in alfalfa at two diverse latitudes. Agronomy J. **48**, 153—156 (1956). — Caroll, J. C., and F. A. Welton: Effect of heavy and late applications of nitrogeneous fertilizer on the cold resistance of Kentucky blue grass. Plant Physiol. **14**, 297—308 (1939). — Christoff, M. A.: Untersuchungen über die Kältefestigkeit

der Wintergerste. Z. Pflanzenzüchtg **13**, 47—90 (1939). — CONSTANTINESCU, E.: Weitere Beiträge zur Physiologie der Kälteresistenz. Planta (Berl.) **21**, 304—323 (1934). — CROOK, E. M., and M. HOLDEN: Some factors effecting the extraction of nitrogeneous materials from leaves of various species. Biochem. J. **43**, 181—185 (1948). — DEXTER, S. T.: Growth, organic nitrogen fractions and buffer capacity in relation to hardiness of plants. Plant Physiol. **10**, 149—158 (1935). — DIXON, M.: Manometric methods. New York 1943. — EDSALL, J. T.: Size, shape and hydration of protein molecules. In H. NEURATH u. K. BAILAY, The Proteins, I B., p. 549—726. New York 1953. — FUCHS, W. H.: Die Veränderung der Struktur und die Reaktion der Zelle bei Abkühlung. Kühn-Arch. **39**, 1—40 (1935). — GORKE, H.: Über chemische Vorgänge beim Gefrieren der Pflanzen. Landwirtsch. Vers.-Stat. **65**, 149—160 (1906). — HEBER, U.: Über eine neue Methode zur quantitativen Stoffbestimmung am Chromatogramm, insbesondere zur Analyse von Zuckern und Aminosäuregemischen. Z. analyt. Chem. **161**, 409—421 (1958). — Ursachen der Frostresistenz bei Winterweizen. I. Mitt. Die Bedeutung der Zucker für die Frostresistenz. Planta (Berl.) **52**, 344—372 (1958a). — Ursachen der Frostresistenz bei Winterweizen. II. Mitt. Die Bedeutung von Aminosäuren und Peptiden für die Frostresistenz. Planta (Berl.) **52**, 431—446 (1958b). — Beziehungen zwischen der Größe von Chloroplasten und ihrem Gehalt an löslichen Eiweißen und Zuckern im Zusammenhang mit dem Frostresistenzproblem. Protoplasma (1959 im Druck). — HENZE, J.: Untersuchungen über den Kohlenhydrat-Eiweiß-Haushalt der Rinde in seiner Beziehung zur Frostresistenz von Obstgehölzen. Z. Bot. **47**, 42—87 (1959). — HODGSON, H. J., and R. J. BULA: Hardening behavior of sweet clover varieties in a subarctic environment. Agronomy J. **48**, 157—160 (1956). — JEREMIAS, K.: Zur Physiologie der Frosthärtung unter besonderer Berücksichtigung von Winterweizen. Planta (Berl.) **47**, 81—104 (1956). — KESSLER, W.: Über die inneren Ursachen der Kälteresistenz der Pflanzen. Planta (Berl.) **24**, 312—352 (1935). — KESSLER, W., u. W. RUHLAND: Weitere Untersuchungen über die inneren Ursachen der Kälteresistenz. Planta (Berl.) **28**, 159—204 (1938). — LEVITT, J.: Investigations on the cytoplasmic particulates and proteins of potato tubers. III. Protein synthesis during the breaking of the rest period. Physiol. Plantarum (Cph.) **7**, 597—601 (1954). — The role of carbohydrates in frost resistance. 8. Internat. Congr. Botan. **11**, 278—280 (1954a). — The hardiness of plants. New York 1956. — LIDFORSS, B.: Die wintergrüne Flora. Lund 1907. — LUBIMENKO, V.: De l'état de la chlorophylle dans les pastes V C.R. Acad. Sci. (Paris) **173**, 365—367 (1921). — MIRIMAN-JAN, V. A.: Einige physiologisch-biochemische Merkmale, die die Frosthärte von Citruspflanzen kennzeichnen. Dokl. Vses. Ordena Lenina Akad. Sel'skochoz Nauk i V. J. Lenina **21**, 36—39 (1956). Ref. Ber. wiss. Biol. **110**, 242 (1957). — MORRIS, D. L.: Quantitative determination of carbohydrates with Dreywoods anthrone reagent. Science **107**, 254 (1948). — MUDRA, A.: Zur Physiologie der Kälteresistenz des Winterweizens. Planta (Berl.) **18**, 435—478 (1953). — NEWTON, R.: Colloidal properties of winter wheat plants in relation to frost resistance. J. Agric. Sci. **14**, 178—191 (1924). — NEWTON, R., and W. R. BROWN: Seasonal changes in the composition of winter wheat plants in relation to frost resistance. J. Agric. Sci. **16**, 522—538 (1926). — Frost precipitation of plant juice. Canad. J. Res., E **5**, 87—110 (1931). — PISEK, A., u. E. WINKLER: Assimilationsvermögen und Respiration der Fichte (*Picea excelsa* Link.) in verschiedener Höhenlage und der Zirbe (*Pinus cembra* L.) an der alpinen Waldgrenze. Planta (Berl.) **51**, 518—544 (1958). — PUTNAM, F. W.: Protein denaturation. In H. NEURATH u. K. BAILEY, The Proteins, I B, p. 851. New York 1953. — SAKAI, A.: Relation of increase of carbohydrate and water soluble protein to frost-resistance in tree. Low Temperature Science, Ser. B **15**, 17—29 (1957). — The frost hardening process of

woody plant. II. Relation of increase of carbohydrate and water soluble protein to frost resistance. Low Temperature Science, Ser. B **16**, 23—34 (1958). — SATTLER, H.: Beiträge zur Kenntnis des N-Stoffwechsels wintergrüner Pflanzen. Planta (Berl.) **9**, 315—333 (1929). — SCARTH, G. W.: Cell physiological studies of frost resistance. New Phytologist **43**, 1—12 (1944). — SIMINOVITCH, D., and D. R. BRIGGS: The chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to frosthardiness. I. Seasonal variations in the protein content. Arch. Biochem. **23**, 8—17, 17—28 (1949). — Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to its frost hardiness. IV. Effects of ringing on translocation, protein-synthesis and the development of hardiness. Plant Physiol. **28**, 177—200 (1953). — SINGER, S. J., L. EGGMAN, J. M. CAMPBELL and S. G. WILDMAN: The proteins of green leaves. IV. A high weight molecular protein comprising a large part of the cytoplasmic proteins. J. biol. Chem. **129**, 233—239 (1952). — SISSAKJAN, N. M., S. S. MELIK-SARKISSJAN u. E. N. BESINGER: Über die chemischen und elektrochemischen Eigenschaften des Plastideneiweißes. Biochimija **17**, 626—632 (1952). Zit. nach: Zur Biochemie des Eiweißes. Berlin 1956. — STOCKING, C. R.: Chloroplast isolation in nonaqueous media. Plant Physiol. **34**, 56—61 (1959). — STOLL, A., u. E. WIEDEMANN: Chlorophyll. Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **1**, 159—254 (1938). — Chlorophyll. Fortschr. chem. Forsch. **2**, 538—608 (1952). — TONZIG, S.: Sopra la presenza di composti Muco-proteidi nel Chondrioma, nel Nuclo e nel Citoplasma dille Cellule vegetali. Nuovo G. bot. ital., N.s. **49**, 1—10 (1937). Zit. nach JEREMIAS 1956. — I Muco-Proteidi e la vita della cellula vegetale. Padua 1941. — TRANQUILINI, W.: Standortsklima, Wasserbilanz und CO_2-Gaswechsel junger Zirben (*Pinus cembra* L.) an der alpinen Waldgrenze. Planta (Berl.) **49**, 612—661 (1957). — ULLRICH, H., u. U. HEBER: Über die Schutzwirkung der Zucker bei der Frostresistenz von Winterweizen. Planta (Berl.) **48**, 724—728 (1957). — Über das Denaturieren pflanzlicher Eiweiße durch Ausfrieren und seine Verhinderung. Planta (Berl.) **51**, 399—413 (1958). — ULLRICH, H., u. P. VAN VEEN: Weitere Untersuchungen über das Ausfrieren von Kolloiden und Kolloidgemischen im Hinblick auf die plasmatische Frostresistenzforschung an Pflanzen. Kolloid-Z. **100**, 359—395 (1942). — UMBREIT, W. W., R. H. BURRIS and J. E. STAUFFER: Manometric technique and tissue metabolism. Minneapolis 1951. — WARBURG, O.: Photosynthese. Angew. Chem. **69**, 627—633 (1957). — WAUGH, D. F.: Protein-protein-interactions. Advanc. Prot. Chem. **9**, 326—429 (1954). — WILDMAN, S. G., and J. BONNER: The proteins of green leaves. I. Isolation, enzymatic properties and auxin content of spinach cytoplasmic proteins. Arch. Biochem. **14**, 381—413 (1947). — WILDMAN, S. G., and A. T. JAGENDORF: Leaf proteins. Ann. Rev. Plant. Physiol. **3**, 131—148 (1952). — WILHELM, A. F.: Untersuchungen über die Kälteresistenz winterfester Kulturpflanzen unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses verschiedener Mineralsalzernährung und des Stickstoff-Stoffwechsels. Phytopath. Z. **8**, 111—156 (1935).

Dr. U. HEBER,
Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität, Bonn a. Rh.,
Meckenheimer Allee 176

Planta 54, 68—73 (1959)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen

DER NACHWEIS DES REVERSIBLEN HELLROT-DUNKELROT-REAKTIONSSYSTEMS BEI LAUBMOOSEN

Von

LEOPOLD BAUER und HANS MOHR

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Juli 1959)

1. Einleitung

In den letzten Jahren ist gezeigt worden, daß bei sehr vielen Pflanzen das Reversible Hellrot-Dunkelrot-Reaktionssystem (BORTHWICK u. Mitarb. 1952) den durch Licht induzierten Reaktionen zugrunde liegt [Zusammenfassungen bei MOHR (1959a) und BORTHWICK und HENDRICKS (1959)]. Prinzipiell ist es immer so, daß man eine bestimmte Reaktion (z. B. eine Photomorphose) durch Hellrot induzieren kann, und daß eine Bestrahlung mit Dunkelrot, unmittelbar nach dem Hellrot gegeben, den Induktionseffekt wieder aufhebt.

Es war bis jetzt nicht bekannt, ob dieses Photoreaktionssystem auch bei der Entwicklung der Moose eine Rolle spielt. Die vorliegende Arbeit soll diese Lücke unserer Kenntnisse schließen; wir können zeigen, daß dieses System auch bei den Laubmoosen vorhanden ist. Als Reaktion benutzen wir die Keimung der Sporen. Sie wird, wie schon bekannt, durch Licht beeinflußt (vgl. z. B. LISTOWSKI 1927, HEITZ 1942), doch konnten bisher über den Mechanismus der Lichtwirkung keine klaren Einsichten gewonnen werden.

Bei Farnsporen, die man am ehesten mit den Moossporen vergleichen kann, ist bereits vor einigen Jahren gezeigt worden, daß dem Lichteinfluß auf die Keimung dieses Reversible Hellrot-Dunkelrot-Reaktionssystem zugrunde liegt (MOHR 1956).

2. Der Begriff „Keimung"

Bei Archegoniatensporen wird der Begriff „Keimung" keinesfalls einheitlich gebraucht (z. B. LAAGE 1907, FISCHER 1911, DÖPP 1927, ORTH 1936). MOHR (1956) schlägt nach eingehender Diskussion für Farnsporen (*Dryopteris filix-mas*) folgende Keimungskriterien vor: 1. weit aufgerissenes Exospor, 2. starke Ausdehnung des Sporeninhaltes, 3. auffällige Ergrünung des Sporeninhaltes.

Auch die Keimung der Moosspore führt nach unseren Beobachtungen in einer 1. Phase zu einem Stadium, auf das diese Kriterien zutreffen. Im Gegensatz zu den Farnen (*Dryopteris*) läuft aber bei den Moosen die Keimentwicklung nach Erreichung dieses Stadiums nicht selbständig weiter. Vielmehr spielen beim Übergang in die nächste (2.) Phase,

während der die „Keimschläuche" (Rhizoid bzw. Chloronema; vgl. dazu HEITZ 1942) auswachsen, weitere, noch nicht ganz übersehbare Faktoren eine Rolle. So wird unter unseren Versuchsbedingungen z. B. eine zusätzliche, relativ lange Belichtung benötigt; auch Pilzinfektionen üben einen starken Effekt aus. Obwohl man mit gutem Recht auch die 2. Entwicklungsphase noch unter den Begriff „Keimung" rechnen könnte, beschränken wir unsere Untersuchungen nur auf die 1. Phase, die bereits eine deutliche Abhängigkeit von der Belichtung zeigt und sich relativ leicht und genau untersuchen läßt. Als „gekeimt" bezeichnen wir also im Zusammenhang dieser Arbeit in Anlehnung an LISTOWSKI (1927) und MOHR (1956) eine Spore, deren Exospor geplatzt ist, die grünlich ge-

Tabelle 1. *Die verwendeten Keimungskriterien*

	Gekeimte Spore	Ungekeimte Spore
Relativer Durchmesser der Spore	1,5—2	1
Färbung	grün (olivgrün, wenn das Exospor die Spore noch größtenteils bedeckt)	braun
Zustand des Exospors	weit aufgerissen bzw. abgelöst	völlig geschlossen

färbt ist und eine starke Volumenvergrößerung zeigt (vgl. Tabelle 1). Mit diesen Keimungskriterien konnten wir sehr gut arbeiten; es traten nur selten Sporen auf, die man nicht eindeutig als „gekeimt" oder „ungekeimt" klassifizieren konnte.

3. Methodik

a) Das Material. Wir verwenden die Sporen eines auf Blumentöpfen gezogenen Klones von *Funaria hygrometrica* SIBTH., die sich als befriedigend homogen in bezug auf ihre Keimverhalten erwiesen. Während der Zeit der Untersuchungen hat das Sporenmaterial seine Eigenschaften (z. B. seine „Lichtempfindlichkeit") nicht feststellbar geändert.

b) Das Substrat. Die Sporen werden mit Hilfe eines feinen Pinsels möglichst gleichmäßig und unter sterilen Bedingungen (Impfkasten) auf standardisierten Agar (1,5%) ausgesät. Ihm sind folgende Salze zugesetzt (p.a.-Substanzen von Merck): KH_2PO_4 (0,0136%), $MgSO_4$ (0,001%), $CaCl_2$ (0,001%), KNO_3 (0,01%), Eisenzitrat (0,0003%). Es werden 5 ml Agar in Petrischalen von 4 cm Durchmesser und 2 cm Höhe gegossen. Der p_H-Wert des Agars beträgt 5,5 (Messung mit Einstich-Glaselektrode). Bei den Untersuchungen über den Lichteinfluß auf die Keimung müssen die Substratbedingungen mit größter Sorgfalt konstant gehalten werden, da offenbar der Ablauf der Keimung auch vom Substrat sehr modifiziert wird. Für alle zusammenhängenden Versuche muß z. B. der im gleichen Arbeitsgang hergestellte Agarnährboden verwendet werden. — Nach der Aussaat werden auf den Schälchen mit Hilfe von Vaseline Glasscheiben befestigt. Das dadurch entstehende abgeschlossene Luftvolumen in den Schälchen reicht für die 100%ige Keimung aus. Der Abschluß mit Vaseline hat den Vorteil, daß die Luftfeuchtigkeit

in der Schale konstant bleibt und daß der Agar während der Versuchszeit kein Wasser verliert.

c) Die Strahlungsquellen. Die in dieser Arbeit verwendeten Bestrahlungsanlagen sind bei MOHR und SCHOSER (1959) ausführlich beschrieben (z. B. die Standard-Felder für Hellrot bzw. Dunkelrot). Das Dunkelrot wird mit Hilfe des Schott-Filters RG 9 (2 mm) hergestellt.

d) Der allgemeine Versuchsansatz. Unmittelbar nach der Aussaat, die im Tageslicht erfolgt, erhalten alle Schälchen 5 min DR[1]. Dies ist eine reine Vorsichtsmaßnahme. Es besteht nämlich die Möglichkeit, daß die Sporen schon während des Zeitraumes der Aussaat eine gewisse „Lichtempfindlichkeit" zeigen, und daß unter Umständen die einzelnen Schälchen unterschiedlich durch das Tageslicht beeinflußt werden. Durch die 5 min DR werden diese möglichen Effekte des Tageslichts eliminiert, und es werden die Sporen aller Schälchen in genau denselben physiologischen Zustand versetzt. Nach diesen 5 min DR kommen die Schälchen ins Dunkel. 3 Std nach der Aussaat beginnt das Bestrahlungsprogramm. Nach dessen Beendigung kommen die Schälchen wieder ins Dunkel. 72 Std nach Aussaat wird der Prozentsatz der gekeimten Sporen anhand obiger Kriterien bestimmt. Die Temperatur in den Schälchen beträgt sowohl während der Bestrahlung wie auch im Dunkeln 25° C.

e) Fehlerbetrachtung. Es werden pro Schale mindestens 500 Sporen mikroskopisch geprüft („repräsentative Stichprobe"). Die Sporen sind auf dem Agar so dicht gesät, daß pro Blickfeld bei 125facher Vergrößerung im allgemeinen 25 bis 50 Sporen vorhanden sind. Für jedes Bestrahlungsprogramm werden mehrere Parallelversuche durchgeführt. Die in dieser Arbeit angegebenen Prozentzahlen sind stets Mittelwerte. In den Tabellen ist der mittlere Fehler dieser arithmetischen Mittel angegeben und die Zahl der Parallelversuche, die zu diesem Mittelwert beitragen. In den Kurven ist wegen der Übersichtlichkeit auf diese Angaben verzichtet. Die mittleren Fehler liegen hier in derselben Größenordnung.

4. Experimentelle Ergebnisse

a) Wenn wir die Sporen verschieden lange mit Hellrot (HR-Standard-Feld) bestrahlen, so ergibt sich die in Abb. 1 angegebene Kurve. Wie man sieht, ist nach der HR-Bestrahlung der Prozentsatz der gekeimten Sporen stark erhöht. Ein Teil der Sporen keimt bereits im Dunkeln (48%). Gibt man jedoch unmittelbar nach einer 3stündigen Bestrahlung mit HR (Induktion von 81% Keimung) Dunkelrot (DR-Standard-Feld), so wird die Zahl der keimenden Sporen stark reduziert (Abb. 2). DR-Bestrahlung allein (ohne vorangegangene HR-Bestrahlung) führt ebenfalls zu einer leichten Förderung der Keimung

Tabelle 2. *Der Reversibilisierungseffekt von Dunkelrot (Interferenz-Linienfilter, $\lambda_{Max} = 728$ mμ) auf die mit Hellrot (Hellrot-Standard-Feld) induzierte Keimung der Moossporen*

(Die Intensität der Dunkelrotbestrahlung betrug 3500 erg/cm² · sec.) (HR = Hellrot, DR = Dunkelrot; n = Zahl der Parallelversuche)

Bestrahlungsprogramm	% Keimung
3 Std HR	$83 \pm 1{,}0\%$ ($n = 4$)
3 Std HR — 5 min DR .	$65 \pm 1{,}7\%$ ($n = 4$)
3 Std HR — 125 min DR	$67 \pm 0{,}3\%$ ($n = 4$)
Dunkelkontrolle	$48 \pm 0{,}7\%$ ($n = 20$)

[1] Folgende Abkürzungen werden verwendet: HR = Hellrot, DR = Dunkelrot.

(z. B. registriert man nach 2 Std DR 56% Keimung). Dies läßt sich, ebenso wie der leichte Anstieg der Kurve in Abb. 2, damit erklären, daß das verwendete DR einen leichten „HR-Effekt" ausübt (vgl. Mohr 1959b). Nach 3 Std HR ist offenbar die Keiminduktion nur noch bei einem Teil der Sporen reversibel, denn es läßt sich die Keimung nicht ganz bis zu dem durch das DR selbst induzierten Niveau reduzieren. Auch wenn wir mit einem schmalen Band DR (Interferenz-Linienfilter 728 mμ)

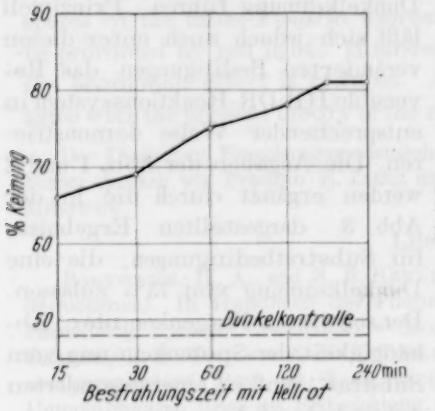


Abb. 1

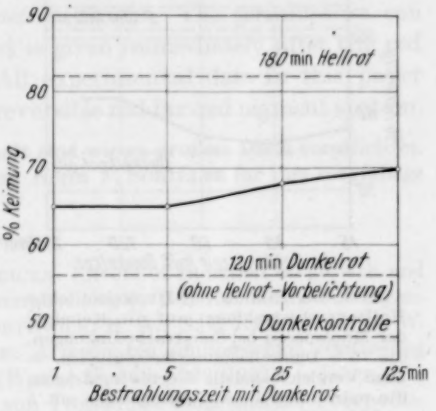


Abb. 2

Abb. 1. Der fördernde Einfluß von Hellrot (Hellrot-Standard-Feld) auf die Keimung von Moossporen *(Funaria hygrometrica* Sibth.)

Abb. 2. Die (teilweise) Reversibilisierung der Hellrot-Induktion der Sporenkeimung durch Dunkelrot (Hellrot- bzw. Dunkelrot-Standard-Feld). Die Bestrahlung mit Dunkelrot setzt unmittelbar nach Beendigung der 180minutigen Hellrotbestrahlung ein. — Zum Vergleich ist der Wert für eine 2stündige Dunkelrotbestrahlung (ohne Hellrotvorbestrahlung) eingetragen

reversibilisieren, erzielen wir keine stärkere Reduzierung der Keiminduktion (Tabelle 2).

b) Einen weiteren Beweis, daß die Reduzierung der HR-Induktion durch nachfolgendes DR tatsächlich mit dem Reversiblen HR-DR-

Tabelle 3. *Der Einfluß einiger Bestrahlungsprogramme mit Hellrot (HR) und Dunkelrot (DR) auf die Keimung der Moossporen*

(HR- bzw. DR-Standardfeld; n = Zahl der Parallelversuche)

Bestrahlungsprogramm	% Keimung
3 Std HR	$82 \pm 0{,}6\%$ ($n = 22$)
3 Std HR — 5 min DR	$64 \pm 1{,}0\%$ ($n = 14$)
3 Std HR — 5 min DR — 5 min HR	$85 \pm 1{,}0\%$ ($n = 8$)
Dunkelkontrolle	$48 \pm 0{,}7\%$ ($n = 20$)

Reaktionssystem zusammenhängt, liefern die Resultate der in Tabelle 3 angegebenen Bestrahlungsprogramme: Die Reversibilisierung der HR-

Induktion durch nachfolgendes DR wird durch eine erneute, kurze Bestrahlung mit HR aufgehoben.

c) Es ist im methodischen Teil betont worden, daß das Substrat mit höchster Sorgfalt konstant gehalten werden muß, wenn die Reproduzierbarkeit der Resultate gewährleistet sein soll. Schon geringfügige Änderungen der Substratverhältnisse können zu einer starken Änderung der Dunkelkeimung führen. Prinzipiell läßt sich jedoch auch unter diesen veränderten Bedingungen das Reversible HR-DR-Reaktionssystem in entsprechender Weise demonstrieren. Die Angaben der Abb. 1 und 2 werden ergänzt durch die in der Abb. 3 dargestellten Ergebnisse für Substratbedingungen, die eine Dunkelkeimung von 75% zulassen. Der schwierige Fragenkomplex „Abhängigkeit der Sporenkeimung vom Substrat" muß in einer gesonderten Arbeit behandelt werden.

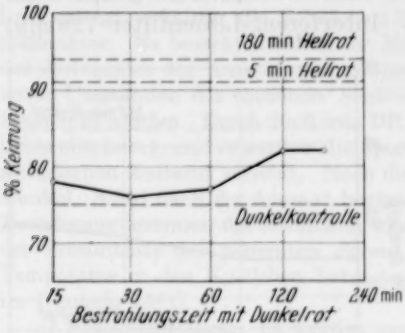


Abb. 3. Der Einfluß von Dunkelrot (ohne Hellrotvorbestrahlung) auf die Keimung der Moossporen bei Substratbedingungen, die 75% Dunkelkeimung ermöglichen. — Zum Vergleich sind die Werte eingetragen, die man unter diesen Bedingungen mit 5 bzw. 180 min Hellrot erzielen kann

5. Diskussion

Die bei der Untersuchung des Lichteinflusses auf die Keimung der Sporen von *Funaria hygrometrica* erzielten Resultate stimmen alle mit der Annahme überein, daß das Reversible HR-DR-Pigmentsystem in diesen Sporen vorliegt, und daß unter den von uns gewählten Substratbedingungen bei einem gewissen Prozentsatz der Sporen die Keimung nur ablaufen kann, wenn es zur Bildung von P_{DR} kommt. Die mit den Moossporen erzielten Ergebnisse stehen alle im Einklang mit den derzeitigen theoretischen Vorstellungen hinsichtlich des Reversiblen HR-DR-Pigmentsystems [vgl. BORTHWICK und HENDRICKS (1959) und MOHR (1959a)]. Das Wesentliche an der vorliegenden Arbeit ist also der Nachweis, daß das Reversible HR-DR-Reaktionssystem, das für Wachstum, Entwicklung und Differenzierung sehr vieler Pflanzen von entscheidender Bedeutung ist, auch bei Laubmoosen vorliegt, und daß diesem Photoreaktionssystem bei der Auslösung der Moossporenkeimung eine Bedeutung zukommt.

Nach diesen Ergebnissen und den Erfahrungen MOHRS (1956) bei Farnen dürfen wir wohl annehmen, daß dieses Reaktionssystem auch innerhalb der Archegoniaten allgemein verbreitet ist. Ferner liegt die Annahme nahe, daß es auch in anderen Abschnitten der Morphogenese der Laubmoose (z. B. bei der lichtabhängigen Bildung von Knospen am

Protonema) eine Rolle spielt. In diese Richtung deuten die Angaben von PRINGSHEIM und PRINGSHEIM (1936), von MITRA und ALSOPP (1959) sowie eigene orientierende Versuche über die Wirkung von Rotlicht auf die Moosknospenbildung.

Summary

In this paper it has been demonstrated that the well-known reversible red far-red reaction system is also involved in the germination of spores of the moss *Funaria hygrometrica* SIBTH. The germination can be promoted by red light. If far-red is given immediately after the red the promotion effect is reduced. All experimental data in this paper agree with the present theory of the reversible red far-red pigment system.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir zu großem Dank verpflichtet. Ferner danken wir Fräulein E. ZIERL und Herrn F. SCHILLER für ihre sorgfältige Mitarbeit.

Literatur

BORTHWICK, H. A., and S. B. HENDRICKS: Effects of radiation on growth and development. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 16. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer (im Druck). — BORTHWICK, H. A., S. B. HENDRICKS, M. W. PARKER, E. H. TOOLE and V. K. TOOLE: A reversible photoreaction controlling seed germination. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **38**, 662—666 (1952). — DÖPP, W.: Untersuchungen über die Entwicklung von Prothallien einheimischer Polypodiaceen. Pflanzenforschung, herausgeg. von R. KOLKWITZ, Heft 8. Jena 1927. — FISCHER, H.: Licht- und Dunkelkeimung bei Farnsporen. Beih. bot. Zbl. **27** (I), 60—32 (1911). — HEITZ, E.: Die keimende *Funaria*-Spore als physiologisches Versuchsobjekt. Ber. dtsch. bot. Ges. **60**, 17—27 (1942). — LAAGE, A.: Bedingungen der Keimung von Farn- und Moossporen. Beih. bot. Zbl. **21** (I), 76—115 (1907). — LISTOWSKI, A.: Über den Einfluß verschieden farbigen Lichts auf die Keimung der Sporen und Entwicklung der Protonemen einiger Moose. Bull. Acad. polon. Sci., Cl. Sci. math. nat., Ser. B, Sci. nat. 631—666 (1927). — MITRA, G. C., and A. ALSOPP: Effects of kinetin, gibberellic acid and certain auxins on the development of shoot buds on the protonema of *Pohlia nutans*. Nature (Lond.) **183**, 974—975 (1959). — MOHR, H.: Die Beeinflussung der Keimung von Farnsporen durch Licht und andere Faktoren. Planta (Berl.) **46**, 534—551 (1956). — Photomorphogenetische Reaktionssysteme in Pflanzen. 1. Teil. Das Reversible Hellrot-Dunkelrot-Reaktionssystem. In: Ergebnisse der Biologie, Bd. 22. Heidelberg: Springer 1959a. — Der Lichteinfluß auf die Haarbildung am Hypokotyl von *Sinapis alba* L. Planta (Berl.) **53**, 109—124 (1959b). — MOHR, H., u. G. SCHOSER: Eine Interferenzfilter-Monochromatoranlage für photobiologische Zwecke. Planta (Berl.) **53**, 1—17 (1959). — ORTH, R.: Morphologische und physiologische Untersuchungen an Farnprothallien. Planta (Berl.) **25**, 104—150 (1936). — PRINGSHEIM, E. G., u. O. PRINGSHEIM: Physiologische Studien an Moosen. 3. Mitteilung: Die Züchtung von Laubmoosprotonemen im Dunkeln. Jb. Bot. **82**, 311—332 (1936).

Dr. L. BAUER und Dr. H. MOHR,
Botanisches Institut der Universität Tübingen, Wilhelmstraße 5

Planta 54, 74—94 (1959)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i.Br.

DIE SELEKTIVE BLOCKIERUNG EINES AN DER BLÜHINDUKTION BETEILIGTEN RIBOSENUCLEINSÄURE-EIWEISS-SYSTEMS DURCH 2-THIOURACIL (UNTERSUCHUNGEN AN *STREPTOCARPUS WENDLANDII*)*

Von

DIETER HESS

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. Juni 1959)

Einleitung

Eine ständig steigende Zahl von Veröffentlichungen befaßt sich mit den äußeren und inneren Bedingungen, die zur Bildung des postulierten Blühstimulus führen. Demgegenüber ist unser Wissen über die Eigenschaften dieses blüteninduzierenden Prinzips selbst gering. Unter den bekannten Daten scheint besonders eine Tatsache Anhaltspunkte zu weiteren Untersuchungen zu geben: Der Blühstimulus ist identisch reproduzierbar. Arbeiten auf dem Gebiet der Photo- wie auch der Thermo-Induktion führten bei einer Reihe von Pflanzen zu diesem Ergebnis (Lit. LANG 1952, MELCHERS 1952, AACH und MELCHERS 1957).

Von Nucleinsäure-Eiweiß-Systemen ist bekannt, daß sie sich in der lebenden Zelle identisch reproduzieren können. Infolgedessen konnte man dem Blühstimulus einige Eigenschaften eines Virus, d.h. eines Nucleoproteids, zuschreiben (s. LIVERMANN 1955, LANG 1957). Das Infektionsgeschehen bei den Phagen sowie die Phänomene der Transduktion und Transformation zeigen für Desoxyribose-Nucleinsäure, die Untersuchungen am Tabakmosaik-Virus für Ribose-Nucleinsäure, daß im System Nucleinsäure-Eiweiß den Nucleinsäuren die tragende Rolle zukommen kann (Lit. BRACHET 1955, 1957, HOTCHKISS 1955, SCHRAMM 1958; GIERER und SCHRAMM 1956).

In bezug auf das Induktionsgeschehen ergibt sich damit die Frage, ob Photo- und Thermo-Induktion zu qualitativen Neubildungen im Nucleinsäure-System der induzierten Zellen führen. Von besonderem Interesse muß dabei die Ribose-Nucleinsäure sein, die in direkter Beziehung zur Synthese der cytoplasmatischen Eiweiße steht, während

* Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. F. OEHLKERS, danke ich für sein lebhaftes Interesse am Fortgang der Arbeit, für die Überlassung von Pflanzenmaterial und Kulturraum in den Gewächshäusern. Die Untersuchungen wurden zum Teil mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, der ich hierfür ebenfalls Dank schulde.

der Einfluß der Desoxyribose-Nucleinsäure hier wohl vor allem indirekter Natur ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, eine Beteiligung spezifischer RNS-Systeme am Induktionsgeschehen durch Blockierung dieser Systeme zu beweisen. Hierzu wurde Thiouracil, ein Antagonist des natürlichen RNS-Bausteins Uracil, verwandt. Als Versuchsobjekt wurde *Streptocarpus wendlandii*, eine unifoliate *Streptocarpus*-Art, gewählt. Die Gründe hierfür waren folgende: Die Induktion führt bei *Streptocarpus wendlandii* zu zwei Vorgängen. Einmal kommt es im Anschluß an die Induktion zu einem starken vegetativen Wachstum des Blattes, zum anderen wird nach Einsetzen dieses Wachstums die Inflorescenz angelegt (Hess 1958). Gehen wir von der Hypothese aus, daß *beide* Prozesse von den RNS-Systemen der Zellen abhängig sind. Das Wachstum ist für die Pflanze kein grundsätzlich neues Geschehen. Es wird demnach auf der Basis einer Vermehrung schon vorhandener RNS-Typen ablaufen. Es fragt sich nun, ob auch die Blühinduktion nur auf quantitativen Veränderungen im RNS-System beruht oder ob es hier zu *qualitativ* neuen RNS-Bildungen kommt. Ein solches, erst im Aufbau begriffenes RNS-System muß aber gegen Thiouracil ungleich empfindlicher sein als die schon vorhandenen Moleküle, die an den Wachstumsprozessen teilnehmen.

Damit ergibt sich die Möglichkeit, die vorliegende Hypothese experimentell zu überprüfen. Sollte es gelingen, bei *Streptocarpus* den Vorgang der Blütenbildung durch RNS-Blockierung zu beeinträchtigen ohne dabei den ebenfalls RNS-abhängigen Wachstumsprozeß zu hemmen, so wäre ein erster Hinweis darauf gewonnen, daß sich spezifisch wirkende RNS-Systeme an der Blütenbildung beteiligen können.

Material und Methode

Als *Versuchsobjekt* wurde eine unifoliate *Streptocarpus*-Form, *Streptocarpus wendlandii* „München", gewählt. Nachteile dieses Objektes sind seine lange Entwicklungszeit bis zur Blühreife (etwa 8 Monate), seine lange optimale Induktionszeit (8 Wochen) und seine Größe. Im Stadium der Blühreife ist der eine Kotyledo, aus dem die Pflanze im wesentlichen besteht, ungefähr 30 cm lang. Die Zahl der Versuchsserien und die Zahl der hierfür verwandten Exemplare mußte deshalb auf ein unbedingt notwendiges Mindestmaß beschränkt werden. Neben den in der Einleitung erwähnten Punkten ist es insbesondere die einfache Gestalt der unifoliaten Arten, die sie für Sprühversuche als besonders geeignet erscheinen läßt (Resende 1952). Eine Beschreibung verschiedener *Streptocarpus*-Arten findet sich bei Oehlkers (1938).

Induktionsbedingungen. Streptocarpus wendlandii „München" braucht zur Blühinduktion Kälte und Kurztag (Oehlkers 1955, 1956). Zur Induktion wurden die Pflanzen 8 Wochen lang in der Klimakammer bei + 10° im 10 Std-Tag gehalten. Lichtintensität: 2500 Lux (Osram HNW 202). Luftfeuchtigkeit: 70—80%.

Chemische Analysen. Zu allen Analysen wurde nur das untere Blattviertel verwandt. In seinem basalen Bereich liegen die Meristeme. Weiterhin haben

Stecklingsversuche gezeigt, daß sich in diesem unteren Blattviertel die blütenbildenden Substanzen anhäufen (OEHLKERS 1955, 1956). Auch die Wuchsstoffschwankungen während der Induktion sind hier am intensivsten (HESS 1958).

Die Mittelrippe wurde stets entfernt. Die eine Hälfte der Spreite wurde zur Bestimmung des Trockengewichtes und des Gesamt-Stickstoffes nach Mikro-Kjeldahl benutzt, während in der anderen Hälfte der RNS- und DNS-Gehalt sowie der Protein-Stickstoff bestimmt wurden. Dazu wurde das kleingeschnittene Blattmaterial mit 70%igem Äthanol, enthaltend 1% $HClO_4$, homogenisiert (2 ml Flüssigkeit auf 1 g Frischmaterial) und nach Abzentrifugieren mit der gleichen Menge desselben Lösungsmittels gewaschen (OGUR und ROSEN 1950). Die Extraktion der Nucleinsäuren erfolgte nach HOLDEN (1952). Diese den Verhältnissen bei Blattmaterial angepaßte Ogur- und Rosen-Methode wurde auch von anderen Autoren (BÖTTGER und WOLLGIEHN 1958) mit Erfolg angewandt. In den erhaltenen Extrakten wurde der RNS- bzw. DNS-Phosphat-Gehalt nach ALLEN (vgl. MARKHAM 1955) bestimmt. Der Rückstand der Nucleinsäure-Extraktionen wurde zweimal mit 70%igem Äthanol, dann mit Äther gewaschen und im Exsiccator getrocknet. Der in diesem Rückstand nach Mikro-Kjeldahl bestimmte Stickstoff wird als Protein-Stickstoff bezeichnet.

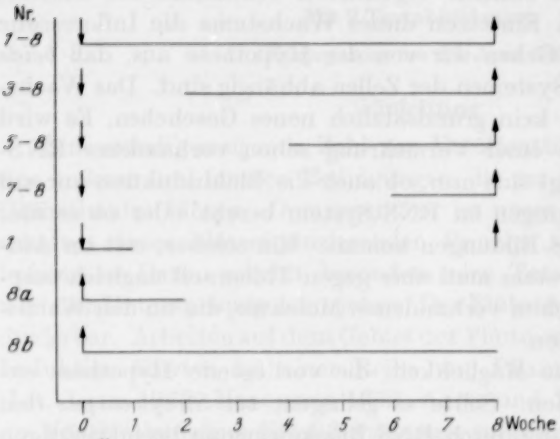


Abb. 1. Übersicht über die Termine der Thiouracil-Behandlungen. ↓ = Beginn, ↑ = Ende der Induktionszeit. Abszisse: Wochen nach Beginn bzw. Ende der Induktion. Ordinate: Versuchsnummern. ——— Dauer der Thiouracil-Behandlung

Zur Trennung der Purinbasen und Pyrimidin-Nucleotide der RNS wurde unter Berücksichtigung vorliegender Methoden (Lit. LINSKENS 1959, MARKHAM 1955, CHARGAFF-DAVIDSON 1955; THOMAS und SHERRATT 1956) folgender Arbeitsgang ausgearbeitet:

Etwa 200 g frisches Blattmaterial wurden nach Entfernung der Mittelrippe mit 70%igem Äthanol, enthaltend 1% $HClO_4$, homogenisiert. Das Homogenisat wurde mit 70%igem Äthanol, Aceton und Äther gewaschen und im Exsiccator getrocknet. Das Trockenpulver wurde in 400 ml 10%igem NaCl suspendiert, das Ganze mit 1 n-NaOH auf p_H 7 gebracht und dann 1 Std lang am Rückflußkühler gekocht. Nach Abzentrifugieren von den ungelösten Bestandteilen wurde die überstehende Lösung mit Essigsäure auf p_H 4 eingestellt und die Nucleinsäuren durch Eingießen in das doppelte Volumen Äthanol gefällt. Der Niederschlag, der auch Eiweiße enthält, wurde mit 70%igem Äthanol, Aceton und Äther gewaschen und im Exsiccator getrocknet. Das gut zerriebene Trockenpulver wurde 18 Std lang mit einigen Millilitern 1 n-KOH bei +20° hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit 70%iger $HClO_4$ auf p_H 1 gebracht, worauf Perchlorat, Proteine und DNS durch Eingießen in das gleiche Volumen Äthanol gefällt wurden. Nach Abzentrifugieren wurde die Lösung mit 1 n-KOH neutralisiert und dann mit verdünntem NH_3 auf p_H 7,5 eingestellt. Nach 2—3stündigem Stehen im Eisschrank

bei + 1° wurde von dem ausgefallenen Perchlorat abzentrifugiert, die Lösung im Vakuum getrocknet, mit 0,5 ml 1 n-HCl aufgenommen und 1 Std lang bei 100° hydrolysiert. Die Trennung der im Hydrolysat enthaltenen Purine und Nucleotide erfolgte direkt durch Papierchromatographie in Isopropanol-Salzsäure-Wasser (vgl. MARKHAM 1955) auf Schl. & Sch. 2043b Mgl. Die Lokalisierung der Substanzen auf den Chromatogrammen erfolgte im UV bei 254 mμ (Quecksilber-Niederdruckbrenner NN 15/44, Hanau).

Die *Behandlung mit 2-Thiouracil* und/oder Uracil wurde während, in einigen Serien auch nach der Induktionsperiode vorgenommen. Die jeweiligen Wochendosen wurden zu gleichen Teilen am Montag und Donnerstag der betreffenden Woche in je 10 ml aqua dest. auf die Blattfläche aufgesprüht. Ein Herabrinnen in die Töpfe ließ sich nicht ganz vermeiden, so daß eine Aufnahme der Substanzen auch durch die Wurzeln wahrscheinlich ist.

Abb. 1 orientiert über die Sprühtermine. Um eine Versuchsserie zu charakterisieren, wird im folgenden die Versuchsnummer aus Abb. 1 zusammen mit der Wochendosis an Thiouracil in Gamma angegeben. Die Wochendosis an Uracil betrug in allen Fällen 10 mg und wurde während der gesamten 8 Induktionswochen gegeben, was durch U symbolisiert werden soll. T 100/1—8 etwa bedeutet: jede Pflanze der Versuchsreihe wurde von der 1.—8. Woche der Induktion mit einer Wochendosis von 100 γ Thiouracil behandelt.

Markierungsversuche mit 2-Thiouracil-2-C^{14}. Zwei stark wachsende, induzierte *Streptocarpus*-Exemplare, die eben eine Inflorescenz anlegten, wurden am 1. und 4. Versuchstag mit je 0,025 mc, insgesamt also 0,05 mc 2-Thiouracil-2-C^{14} pro Pflanze behandelt. Die radioaktiven Lösungen wurden mit einer Pipette auf die Blattflächen aufgeträufelt. Die Pflanzen wurden jeden Tag mit Leitungswasser übersprüht. Vom 8. Tag an erfolgte die Aufarbeitung auf die Nucleinsäure-Fraktionen und auf die Basen und Nucleotide der RNS (vgl. oben). Die Papierchromatogramme wurden in gleich große Stücke geschnitten, deren Radioaktivität ebenso wie die der Nucleinsäure-Fraktionen im Probenwechsler FH 448 (Frieseke und Hoepfner) unter Verwendung des Zeitdruckers FH 449 und des Zählgerätes FH 49 gemessen wurde.

Abkürzungen: Ribose-Nucleinsäure = RNS, Desoxyribose-Nucleinsäure = DNS, Stickstoff = N, Phosphat = P, 2-Thiouracil = T, Uracil = U.

Ergebnisse

A. Die Wirkung von Thiouracil auf Wachstum und Inflorescenzbildung

1. Behandlungen während der Induktionsperiode. Nach der Induktion beginnen die *Streptocarpus*-Blätter stark zu wachsen. Es sollte untersucht werden, bei welcher Wochendosis an Thiouracil dieses Wachstum noch ungehemmt ablaufen kann. Nach den einleitenden Bemerkungen waren für alle weiteren Versuche nur Konzentrationen brauchbar, die das Wachstum nicht beeinträchtigten. Abb. 2 gibt den wöchentlichen Längenzuwachs verschiedener Versuchsserien wieder. Erst eine Wochendosis von 1000 γ Thiouracil, während der ganzen Induktionsperiode appliziert, bewirkt eine länger anhaltende Hemmung des Längenwachstums. In allen anderen Fällen läßt sich keine wesentliche Veränderung des Zuwachses gegenüber der Kontrolle erkennen. Auch Uracil übt keinerlei Wirkung aus.

Damit ergibt sich die Frage, ob Thiouracil-Konzentrationen, die ein ungestörtes Längenwachstum gestatten, die Inflorescenzanlage in irgendeiner Weise beeinflussen können. Gleichzeitig sollte ermittelt werden, in welchem Zeitabschnitt der 8 Induktionswochen etwa thiouracilempfindliche Vorgänge ablaufen. Zu diesem Zweck wurde die Besprühung nach 0, 2, 4, 6 Wochen Induktion begonnen und bis zum Ende der Induktion fortgesetzt (Abb. 1). Die Wochendosen betrugen in verschiedenen Versuchsreihen 100, 200, 400 und 1000 γ Thiouracil.

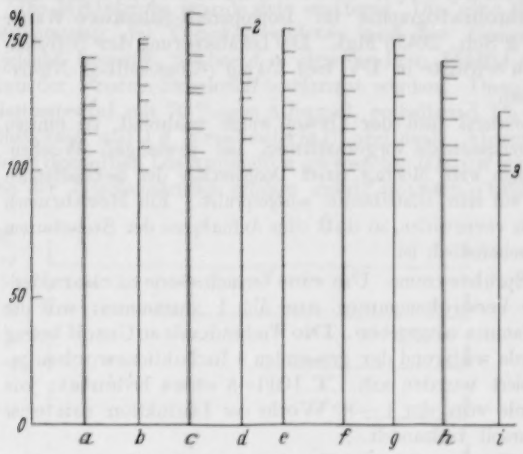


Abb. 2. Längenwachstum der *Streptocarpus*-Blätter nach der Induktion. Länge bei Induktionsende = 100 %. *a* induzierte Pflanzen ohne jede Chemikalien-Behandlung = Blühkontrollen, *b* U, *c* T 200/1—8, *d* T 200 + U/1—8, *e* T 100/1—8, *f* T 100 + U/1—8, *g* T 400/1—8, *h* T 400 + U/1—8, *i* T 1000/1—8. Die Querstriche geben die Wochen nach Ende der Induktion an: erster Querstrich = Woche 0 = Induktionsende, letzter Querstrich = 7. Woche nach Ende der Induktion. *2* oder *3* an den Querstrichen: die Meßwerte für 2 oder 3 Wochen fallen zusammen

In den folgenden Abbildungen und Tabellen wird die Woche als Woche 1 bezeichnet, in der die Inflorescenzanlagen der Kontrollpflanzen eben makroskopisch sichtbar waren, was in der 3. oder 4. Woche nach der Induktion stets bei *allen* Kontrollen *gleichzeitig* der Fall war. Desto auffälliger ist jede Verzögerung in der Anlage der Inflorescenzen.

Tabelle 1. *Thiouracil-Behandlungen in der ersten Woche der Induktion*

Jahr	Behandlung	Zahl der Pflanzen	Pflanzen mit Inflorescenzen (3—4 Monate nach der Induktion)
1957	T 3200/1	4	0
	—	4	4
1958	T 3200/1	6	3
	—	6	6

Die Inflorescenzbildung wird tatsächlich durch die erwähnten Thiouracil-Konzentrationen stark gestört (Abb. 3). Je nach der Wochendosis kommt es zu einer Verzögerung oder gar zu einer völligen Blockierung der Inflorescenzanlage. Pflanzen, die nach Abb. 3 keinen Blütenstand anlegten, blieben auch bei weiterer monatelanger Beobachtung rein vegetativ. Je stärker die Wochendosis, desto stärker die Wirkung. Bei den beiden geringeren Konzentrationen fällt folgendes auf: in den Versuchen 2 und 8 wurde mit der gleichen Gesamtmenge an Thiouracil

behandelt, einmal jedoch über die ganze Induktionszeit ausgedehnt, das andere Mal während der letzten 4 Wochen. Eine Verzögerung der Inflorescenzbildung tritt nur im ersten Fall ein. Demnach scheinen die thiouracil-empfindlichen Vorgänge vor allem in der ersten Hälfte der Induktionsperiode abzulaufen. Versuche, bei denen eine hohe Thiouracil-Dosis nur in der ersten Woche gegeben wurde, bestätigen diese Annahme (Tabelle 1). Der Effekt ist ungleich stärker als bei Verteilung

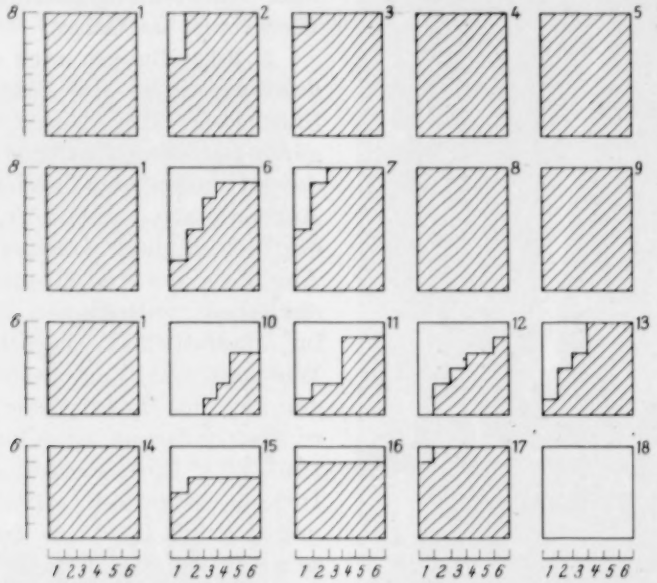


Abb. 3. Die Wirkung von Behandlungen mit Thiouracil, Uracil sowie von Uracil und Thiouracil auf die Anlage der Inflorescenzen. Abszisse: Wochen nach der Induktion von Woche 1 (s. Text) an. Ordinate = Gesamtzahl der Pflanzen. Schraffiert diejenigen Pflanzen, die in der betreffenden Woche makroskopisch sichtbare Inflorescenzanlagen aufwiesen. *1* Blühkontrollen, *2* T 100/1—8, *3* T 100/3—8, *4* T 100/5—8, *5* T 100/7—8, *6* T 200/1—8, *7* T 200/3—8, *8* T 200/5—8, *9* T 200/7—8, *10* T 400/1—8, *11* T 400/3—8, *12* T 400/5—8, *13* T 400/7—8, *14* U, *15* T 400 + U/1—8, *16* T 100/1—8, *17* T 100 + U/1—8, *18* T 1000/1—8

derselben Dosis über alle 8 Wochen (vgl. Abb. 3, *10*). Wie entsprechende Messungen zeigten, ist das Wachstum auch hier normal. Die Hemmung läßt sich durch Uracil aufheben (s. unten), ist also nicht mit einer toxischen Wirkung der höheren Pyrimidin-Konzentration erklärbar.

Hohe Dosen von Thiouracil (Wochendosis $\geqq 1000\,\gamma$) verhindern die Inflorescenzbildung bei allen behandelten Pflanzen, wie in verschiedenen Versuchsreihen gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 3, *18*). Doch wird stets auch das Wachstum blockiert. Eine Beseitigung der Hemmung durch Uracil in der angegebenen Konzentration ist nicht mehr möglich, so daß eine toxische Wirkung des Thiouracils in Betracht gezogen werden muß. Bemerkenswert ist immerhin, daß das Wachstum in allen Fällen schließlich wieder aufgenommen wird (Abb. 2), während Inflorescenzen

nie angelegt werden. Das Wachstum setzt in den einzelnen Blattpartien ungleich ein. Zunächst kommt es zu einem Wachstum der Mittelrippe, dem die Spreite nicht folgen kann, denn in den Lamina bilden sich senkrecht zur Mittelrippe Spalten, die bei weiterer Dehnung bis zum Blattrand hin aufreißen (Abb. 4). Über verschiedene Zwischenformen wird dann die normale Blattgestalt wieder ausgebildet. Eine Auswertung dieser Vorgänge in histologischer und entwicklungsgeschichtlicher Hinsicht ist im Gange.

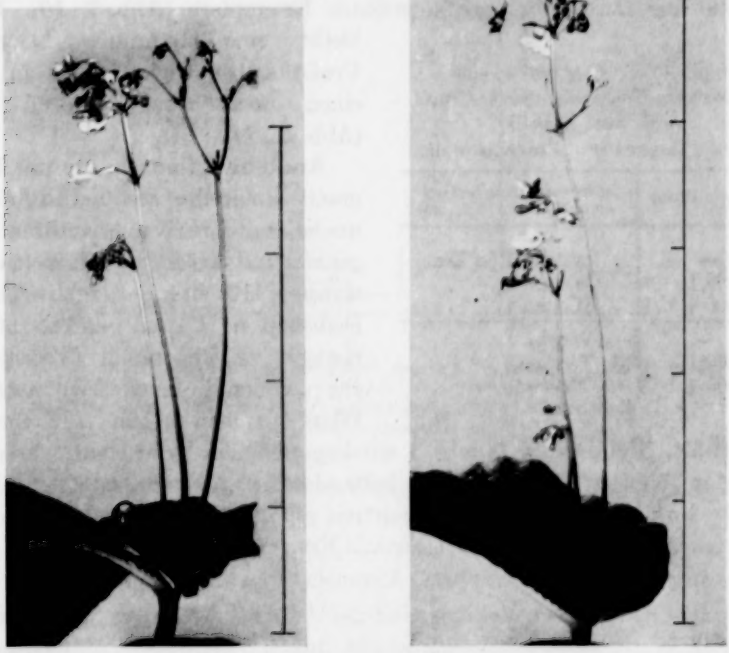
Abb. 4. *Streptocarpus*-Blatt 4 Monate nach der Induktion. In den Wochen 1—4 der Induktionszeit wurde eine Wochendosis von jeweils 3000 γ Thiouracil gegeben

2. Behandlungen nach der Induktionsperiode. Die hohe Empfindlichkeit der Induktionsvorgänge gegenüber Thiouracil könnte darauf beruhen, daß Thiouracil den Aufbau von Systemen stört, die für die Blütenbildung notwendig sind. Am Ende der Induktionsperiode sind diese synthetischen Prozesse im wesentlichen abgeschlossen. Wie auch Stecklingsversuche zeigen, liegt der Blühstimulus in ausreichender Menge vor (OEHLKERS 1955/56). Eine Hemmung der Inflorescenzbildung sollte dann ungleich schwerer zu erreichen sein. In der Tat läßt sich nach der Induktion die Bildung des Blütenstandes nur noch durch eine Überdosis von Thiouracil entscheidend beeinflussen (Tabelle 2, *8a*). Eine niedere Dosis dagegen, die, während der Induktion verabreicht, zu Hemmungen führt (Abb. 3, *6*), hat keinerlei Wirkung auf die *Anlage* der Inflorescenz. Dagegen wird in diesem Fall die weitere *Entwicklung* der Blütenstände gestört (Abb. 5).

Tabelle 2. *Thiouracil-Behandlungen nach der Induktion*

Behandlung	Zahl der Pflanzen	Pflanzen mit Inflorescenzen	Wachstum des Blattes	Entwicklung der Inflorescenzen
T 3000/8a	4	1, Anlage verzögert	Zunächst blockiert	Langsamer als bei den Kontrollen, Auftreten abnormer Blüten
T 200/8b	8	8, Anlage wie bei den Kontrollen	Völlig normal	

Die Inflorescenzen wachsen langsamer empor und weisen einen hohen Prozentsatz abnormer Blüten auf. An Abweichungen wurden beobachtet: a) normale Ausbildung der Sepalen, aber übrige Blüte zu einem kleinen grünen Knauf reduziert; b) Ausfall von Petalen; c) Erhöhung der Zahl der Staubblätter auf 3 und 4; d) Schlitzblätterigkeit, entweder zwischen einzelnen oder allen Petalen; e) Kombinationen zwischen b—d. Bei der Serie 8b/200 (Tabelle 2) waren 15 Wochen nach



a b

Abb. 5a u. b. Pflanze der Serie T 200/8b 12 Wochen nach der Induktion (a) und die entsprechende Blühkontrolle (b). Die Einheiten des Maßstabes betragen 10 cm

der Induktion an der ersten serialen Inflorescenz durchschnittlich 54 Blüten makroskopisch zu erkennen. Darunter waren 18 abnorm. Die Zahl der Blüten ist gegenüber den Kontrollen nicht verändert. Die später angelegten serialen Inflorescenzen sind wieder völlig normal.

Schlitzblätterigkeit und Verstärkung der männlichen Tendenz durch Erhöhung der Staubblattzahl wurden hier modifikativ bewirkt. Die gleichen Effekte können in der Gattung *Streptocarpus* auch durch Kombination bestimmter Genome und Plasmone erzielt werden (Oehlkers 1938).

B. Der Wirkungsmechanismus des Thiouracils

Die folgenden Versuche hatten zum Ziel, Hinweise auf den Wirkungsmechanismus des Thiouracils zu gewinnen.

1. Beseitigung des Thiouracil-Effektes durch Uracil. Bei geringeren Wochendosen von Thiouracil läßt sich die Hemmung der Inflorescenzanlage durch Zufuhr von Uracil aufheben (Abb. 3, *16*, *17*). Bei Verwendung höherer Dosen an Thiouracil ist das nicht mehr vollständig möglich. Jedoch bilden auch in diesem Fall die mit Thiouracil und Uracil behandelten Pflanzen (Abb. 3, *15*) schneller Inflorescenzanlagen als die nur mit Thiouracil besprühten Exemplare (Abb. 3, *10*). Doch bleibt eine Hemmung bestehen. Uracil selbst wirkt weder in dem einen noch dem anderen Sinn (Abb. 3, *14*).

Tabelle 3. *Beseitigung der Thiouracil-Hemmung durch Uracil (vgl. auch Abb. 3). Zwei Pflanzen pro Versuchsansatz*

Behandlung	Inflorescenzen bei beiden Pflanzen sichtbar
—	Woche 1 (s. Text)
T 1600/1	Woche 3
T 1600 + U/1	Woche 1
—	Woche 1
T 3200/1	Woche 2
T 3200 + U/1	Woche 1

Auch bei Pflanzen, die mit Thiouracil nur in der ersten Induktionswoche, mit Uracil aber während der ganzen Induktionsperiode behandelt wurden, läßt sich der gleiche Effekt beobachten: Uracil wirkt antagonistisch zu Thiouracil (Tabelle 3). Die zu den Versuchen verwandten Pflanzen waren im allgemeinen gleich alt. Bei den in Tabelle 3 wiedergegebenen Versuchen waren die mit der höheren Thiouracildosis behandelten Pflanzen bedeutend älter als die im entsprechenden Versuch mit der niederen Dosis. Die wiederholt beobachtete geringere Thiouracil-Empfindlichkeit der älteren (und größeren!) Pflanzen erklärt den Versuchsausfall.

2. Der Einbau von 2-Thiouracil-2-C^{14} in die RNS von Streptocarpus wendlandii. Hemmungserscheinungen durch Thiouracil konnten mehrfach durch Uracil behoben werden (Lit. CHARGAFF-DAVIDSON 1955, BRACHET 1957). Bei höheren Pflanzen wurden entsprechende Versuche von BER (1949), HÖHN (1954, 1955) und KESSLER (1956) durchgeführt. Eine Erklärungsmöglichkeit für die Thiouracil-Hemmungen und den Antagonismus Thiouracil—Uracil liegt in dem Einbau von Thiouracil anstelle von Uracil in die RNS. Ein solcher Einbau wurde für das Tabakmosaik-Virus (JEENER und ROSSEELS 1953, MATTHEWS 1956, MANDEL, MARKHAM und MATTHEWS 1957) und für *Bacillus megatherium* (HAMERS 1956) nachgewiesen. Für höhere Pflanzen liegt lediglich eine Notiz von MATTHEWS (1956) vor, nach der bei *Nicotiana* radioaktives Thiouracil zu einem allerdings geringen Prozentsatz (0,3%) Uracil in der RNS zu verdrängen vermag. Um eine sichere Basis zu schaffen, mußte deshalb

untersucht werden, ob Thiouracil auch in die RNS von *Streptocarpus* eingebaut werden kann.

Nach vergeblichen Versuchen mit nichtmarkiertem Thiouracil führte schließlich die Anwendung radioaktiver Substanz zum Erfolg. Zunächst ließ sich feststellen, daß sich bei einer Fraktionierung der Nucleinsäuren mittels $HClO_4$ der überwiegende Teil der Radioaktivität in der RNS-Fraktion befindet. Die Auswertung von Chromatogrammen mit Hydrolysaten von *Streptocarpus*-RNS zeigte, daß sich das Maximum an Strahlungsintensität auf Höhe der Uridylsäure befindet (Abb. 6). Wie

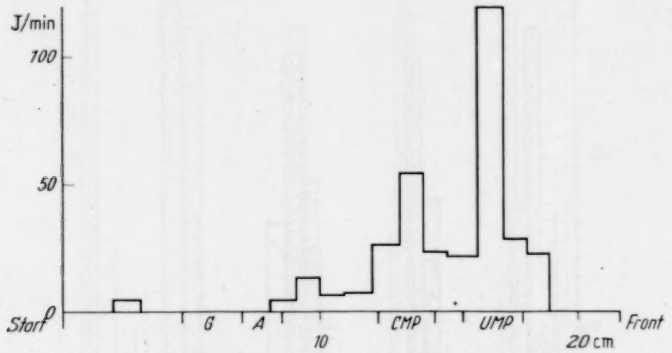


Abb. 6. Auswertung eines Chromatogrammes mit RNS-Hydrolysat auf Radioaktivität. Abszisse: Laufstrecke in Zentimetern, Ordinate: Impulse/min. Auf der unteren Geraden Lage von Guanin (*G*), Adenin (*A*), Cytidylsäure (*CMP*), Uridylsäure (*UMP*) auf dem Chromatogramm

Matthews (1956) nachwies, hat Thiouridylsäure in dem Isopropanol-Salzsäure-Gemisch den gleichen R_f-Wert wie Uridylsäure. Damit scheint gesichert zu sein, daß Thiouracil in Form von Thiouridylsäure in die RNS von *Streptocarpus* eingebaut wird. In der RNS des Tabakmosaik-Virus konnten neben Thiouridylsäure noch Thiouridin, Thiouridin-3,5-diphosphat sowie Adenyl- und Guanyl-Thiouridylsäure aufgefunden werden (Mandel, Markham und Matthews 1957). Da auch bei *Streptocarpus* neben dem erwähnten Maximum noch weitere strahlungsaktive Stellen auf den Chromatogrammen vorhanden sind, dürften hier ähnliche Verhältnisse vorliegen.

C. Chemische Analysen

Thiouracil kann bei *Streptocarpus* in die RNS eingebaut werden und so zu Störungen in der RNS- und Eiweiß-Synthese führen. Die Notwendigkeit, Nucleinsäuren- und Eiweiß-Gehalt zu untersuchen, ergibt sich jedoch vor allem auch aus folgendem Grund. Bei *Streptocarpus* lassen sich durch Thiouracil-Behandlung der Vorgang des vegetativen Wachstums im Anschluß an die Induktion und der der Inflorescenzanlage

voneinander trennen. Als Kriterium diente dabei ein ungestörtes Wachstum des Blattes bei verzögerter oder gehemmter Inflorescenzanlage. Das meßbare Wachstum resultiert aus Plasmawachstum und vor allem Streckungswachstum. Vom Streckungswachstum ist nun aber bekannt, daß es unter Umständen ohne stärkeres Plasmawachstum, d.h. ohne umfassende Eiweiß-Synthese, stattfinden kann (POHL 1954). Es wäre demnach denkbar, daß trotz einer tiefgehenden Störung in der RNS-

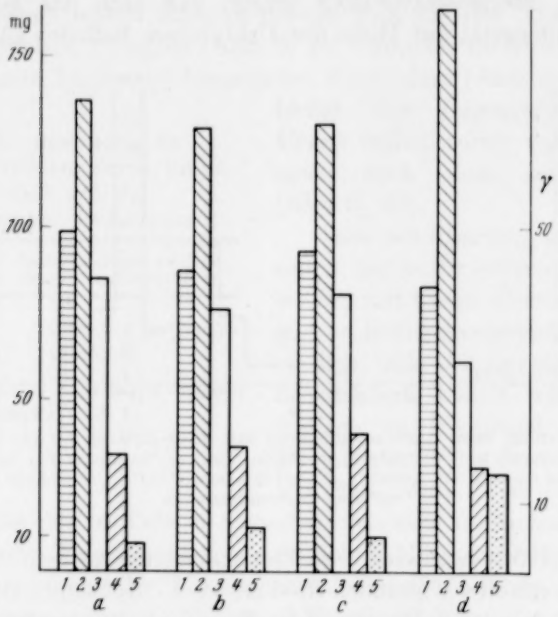


Abb. 7. Chemische Analysen 7 Wochen nach Abschluß der Induktion. Abszisse: *a* Blühkontrollen, *b* U, *c* T 400/1—8, *d* T 1000/1—8. *1* Trockengewicht, *2* Gesamt-N, *3* Protein-N, *4* RNS-P, *5* DNS-P. Ordinate: Mengen in Milligramm (1) oder Milligramm · 100 (2—3) oder γ (4—5) pro Gramm Frischgewicht

und Protein-Synthese das Wachstum äußerlich normal verläuft, weil auch eine nur geringfügige Eiweiß-Synthese das Streckungswachstum noch ermöglicht. In diesem Fall wäre aber nicht zu entscheiden, ob die Blühhemmung Folge einer groben Schädigung der ebenso für das Wachstum notwendigen Systeme oder Folge einer Blockierung von für die Blütenbildung spezifischen RNS-Systemen ist. Daß ein Ausfall solcher spezifischer Systeme, die nur einen geringen Bruchteil der RNS-Eiweiß-Systeme der Zelle ausmachen können, zu einem quantitativ meßbaren Defekt führen würde, war nicht zu erwarten.

1. Chemische Analysen 7 Wochen nach der Induktion. Die ersten vergleichend chemischen Untersuchungen wurden 7 Wochen nach der Induktion ausgeführt. Der Zeitpunkt war so gewählt, daß noch keine

allzu tief greifenden sekundären Veränderungen im Zusammenhang mit dem Auswachsen der Inflorescenzen zu erwarten waren. Die Inflorescenzen der Kontrollpflanzen waren einige Zentimeter, die der thiouracilbehandelten Pflanzen — soweit überhaupt vorhanden — 10—15 mm hoch. Zu den Analysen wurden nur Pflanzen mit Inflorescenzanlagen verwandt. Zwei verschiedene Serien thiouracil-behandelter Pflanzen kamen zur Untersuchung, einmal solche, die eine Wochendosis von 400 γ 8 Wochen lang erhalten hatten, zweitens solche, die ebenso 1000 γ empfangen hatten. Bei jenen war bei ungestörtem Wachstum die Blüten-

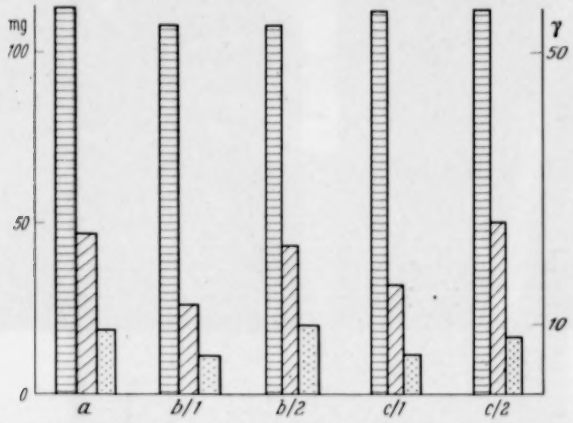
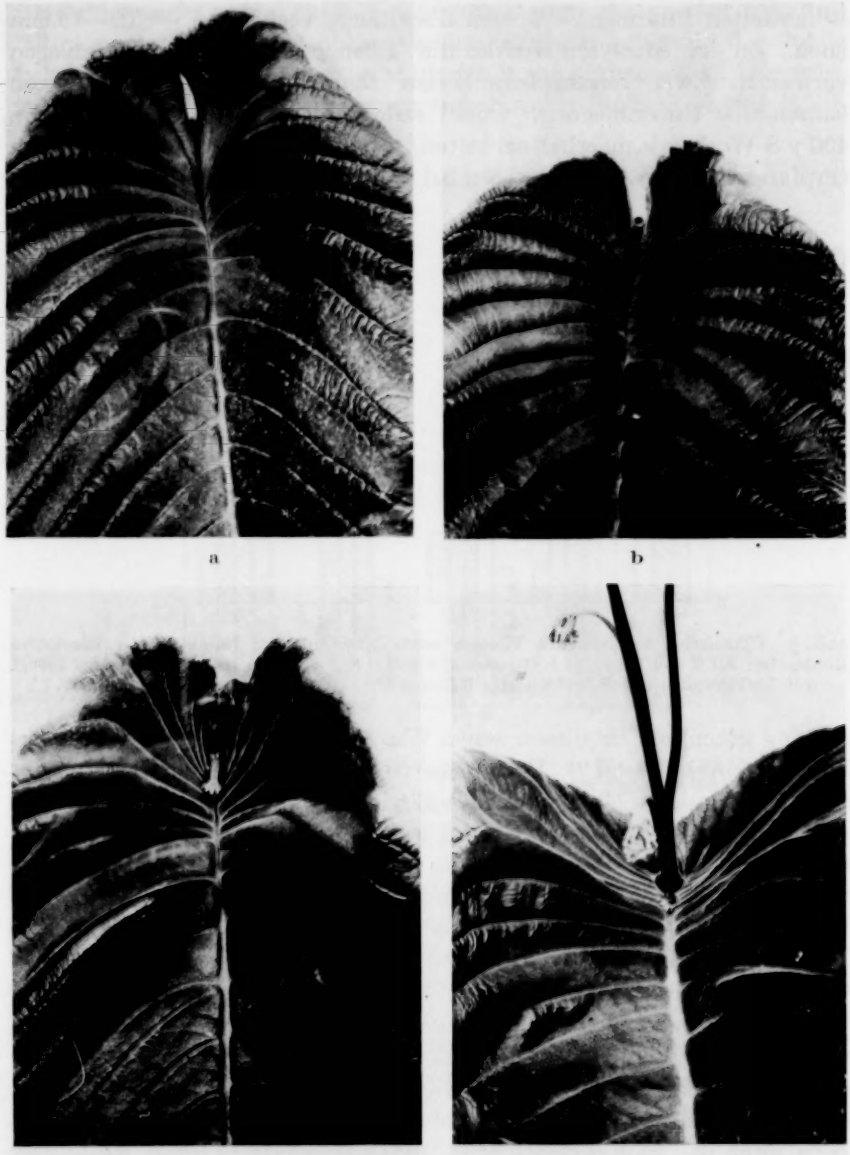


Abb. 8. Chemische Analysen 13 Wochen nach Abschluß der Induktion. *a* vegetative Kontrollen, *b/1* T 400/1—8 mit Inflorescenz, *b/2* T 400/1—8 ohne Inflorescenz, *c/1* T 3200/1 mit Inflorescenz, *c/2* T 3200/1 ohne Inflorescenz. Sonstige Symbole wie in Abb. 7

bildung gehemmt, bei diesen waren Wachstum und Blütenbildung blokkiert (vgl. Abb. 2 und 3). Die Wachstumsmessungen finden ihr Korrelat in den chemischen Analysen. Alle Serien mit ungestörtem Wachstum, also die Kontrollen, die mit Uracil und die mit weniger Thiouracil behandelten Reihen, weisen ungefähr gleiche Werte für Trockengewicht, Gesamt-N, Protein-N, RNS-P und DNS-P auf. Eine Störung der Nucleinsäure- oder Eiweiß-Synthese ist nicht festzustellen (Abb. 7).

Demgegenüber weisen diejenigen Pflanzen, bei denen nach Applikation hoher Thiouracil-Dosen auch das Wachstum aussetzte, entscheidende Veränderungen auf (Abb. 7). Besonders auffällig ist das Ansteigen des Gesamt-N bei gleichzeitigem Absinken des Protein-N, d. h. die Zunahme des löslichen N. Auch der RNS-Gehalt nimmt ab. Die Daten liefern einen weiteren Beleg dafür, daß bei Hemmung des RNS-Systems der Zelle auch die Eiweißsynthese in Mitleidenschaft gezogen wird. Der DNS-Gehalt ist stark erhöht. Die DNS-Fraktion hatte nach Behandlung der Pflanzen mit C^{14}-Thiouracil eine geringe Radioaktivität aufgewiesen. Falls diese Strahlung nicht von Resten an RNS, sondern von in die

DNS eingebautem Thiouracil herrühren sollte, so bleibt doch die Neubildung von DNS davon unberührt.



a b c d

Abb. 9. Pflanzen mit Blühhemmung oder Blühverzögerung mit den entsprechenden Kontrollen. a vegetative Kontrollen, b T 3200/1 blühgehemmt, c T 3200/1 blühverzögert, d Blühkontrollen, e T 400/3—8 blühgehemmt, f T 400/3—8 blühend. a—d und e—f in gleichem Maßstab. a—d 13, e—f 15 Wochen nach Abschluß der Induktion

2. Chemische Analysen 13 Wochen nach der Induktion. Zu den unter 1. beschriebenen Analysen waren nur Pflanzen mit bereits sichtbarer

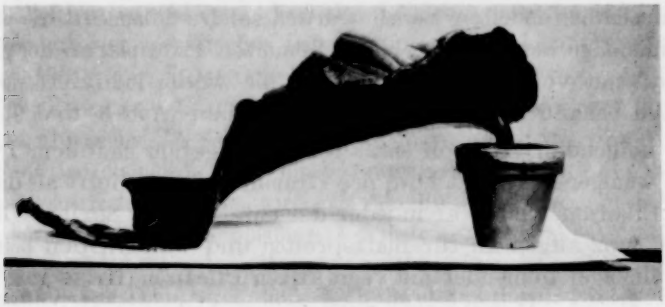


Abb. 9e

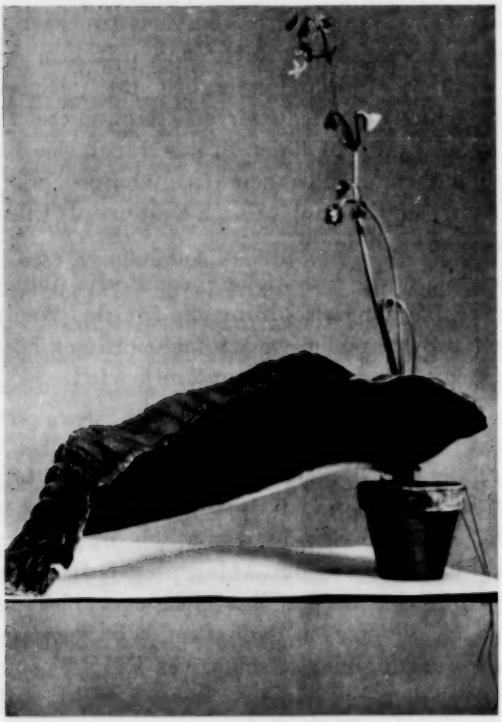


Abb. 9f

Inflorescenzanlage herangezogen worden. Obwohl die thiouracil-behandelten Exemplare ihre Inflorescenzen viel später als die Kontrollen anlegten, also deutliche Hemmungserscheinungen aufwiesen, könnte man den Einwand machen, daß diese Pflanzen eben doch schließlich zur Blüte

kommen. Deshalb mußten auch Pflanzen untersucht werden, die nach Thiouracil-Behandlung völlig vegetativ blieben. 13 Wochen nach Abschluß der Induktion besteht Sicherheit über den Erfolg der Besprühung. In thiouracil-behandelten Serien wurden solche Pflanzen, die eine Inflorescenzanlage besaßen, mit blühgehemmten Exemplaren der gleichen Serie und mit vegetativen Kontrollen, die weder induziert noch mit Thiouracil behandelt worden waren, verglichen (Abb. 8 und 9).

Alle blühenden Pflanzen enthalten bei ungefähr gleichem Trockengewicht weniger RNS und DNS pro Gramm Frischgewicht als die vegetativen Pflanzen, und zwar in jeder der untersuchten Serien. Die Aussage gilt ganz allgemein für Blattspreiten und Mittelrippen beim Vergleich beliebiger blühender mit vegetativen Pflanzen (HESS 1959).

Gegenüber den Verhältnissen 7 Wochen nach der Induktion enthalten blühende Pflanzen weniger RNS pro Frischgewichtseinheit. Die Veränderungen stehen gewiß nur indirekt im Zusammenhang mit der Blühinduktion. Sie sind sekundärer Natur und mit dem Auswachsen der Inflorescenzen verknüpft. Entscheidend ist, daß blühgehemmte Pflanzen sich von überhaupt nicht induzierten Pflanzen chemisch nicht mehr unterscheiden lassen und daß dieser Status durch eine Vermehrung der RNS gegenüber blühenden Pflanzen der gleichen Serie erreicht wird. Von einem groben Eingriff in das RNS-System als Ursache der Blühhemmung ist nichts zu bemerken.

Die chemischen Analysen bestätigen somit die Auffassung, daß bei entsprechender Thiouracil-Behandlung die für das Wachstum notwendigen RNS-Eiweiß-Systeme ungestört funktionieren können, während die Blühinduktion verhindert oder verzögert wird.

Diskussion

Die durch Thiouracil-Behandlung von *Streptocarpus* gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß durch Thiouracil eine selektive Blokkierung von RNS-Eiweiß-Systemen möglich ist, die im Zusammenwirken mit anderen Faktoren die Anlage der Inflorescenz bestimmen, für das vegetative Wachstum des Blattes dagegen nicht notwendig sind. Damit ergeben sich die Fragen nach dem Wirkungsmechanismus des Thiouracils, nach der Möglichkeit selektiver RNS-Blockierungen durch Thiouracil und nach dem Zusammenspiel der RNS-Eiweiß-Systeme mit anderen Faktoren bei der Blühinduktion.

1. Der Wirkungsmechanismus des Thiouracils. Neben RNS existieren in der Zelle noch andere uracil-haltige Strukturen, z. B. Nucleotide, die als Cofermente fungieren können (CARDINI, PALACHINI, CAPUTTO und LELOIR 1950a, b, SCHMITZ, HURLBERT und VAN POTTER 1954, KALCKAR 1954; weitere Lit. CHARGAFF-DAVIDSON 1955). Abgesehen davon, daß

ein Einbau von Thiouracil an Stelle von Uracil in diese Systeme nicht nachgewiesen ist, läßt sich der Ausfall ganz spezifischer morphogenetischer Leistungen nur schwer durch teilweise Blockierung z. B. der Galakto-Waldenase erklären. Von der RNS hingegen ist bekannt, daß sie Träger solcher spezifischer Informationen sein kann (GIERER und SCHRAMM 1956; Lit. SCHRAMM 1954, CHARGAFF-DAVIDSON 1955, BRACHET 1957, FRAENKEL-CONRAT et al. 1957). Der Einbau von Thiouracil läßt dann abnorme RNS-Moleküle entstehen, die diesen ihren spezifischen Funktionen nicht mehr nachkommen können.

Von verschiedener Seite wird die Möglichkeit erwogen, RNS und Protein könnten aus gemeinsamen Vorstufen, Nucleotid-Aminosäuren-Komplexen, gebildet werden (MICHELSON 1958, SIMKIN und WORK 1958). Die Wirkung des Thiouracils ließe sich durchaus durch Einbau in diese Komplexe erklären. Aus abnormen Vorstufen würden dann erstens abnorme RNS-Moleküle, zweitens abnorme Proteine gebildet. Auch nach dieser Hypothese wäre demnach der Wirkungsmechanismus des Thiouracils in einer Blockierung von RNS-Eiweiß-Systemen zu suchen.

2. Selektive Hemmungen von RNS-Eiweiß-Systemen durch Thiouracil. Bei höheren Pflanzen sind bereits hemmende Thiouracil-Einflüsse auf Wachstum und Entwicklung verschiedener Objekte beschrieben worden (BER 1949, HÖHN 1954/55). Jedoch wurden die Beobachtungen nicht durch chemische Analysen ergänzt. Es läßt sich also nicht entscheiden, ob die beobachteten Erscheinungen auf eine Schädigung des gesamten RNS-Protein-Systems oder auf eine selektive Blockierung nur bestimmter Teile dieses Gesamt-Systems zurückzuführen sind.

Daß eine generelle Protein-Abnahme einschneidende morphogenetische Folgen haben kann, wiesen HOTTA und OSAWA unter Verwendung von Antagonisten nach. Bei *Dryopteris erythrorsa* wächst der Gametophyt zunächst eindimensional, bildet dann aber nach einiger Zeit durch zweidimensionales Wachstum das eigentliche Prothallium. Das eindimensionale Wachstum ist durch einen leichten Abfall im Eiweißgehalt gekennzeichnet. Beim Übergang zum zweidimensionalen Wachstum erfolgt ein starker Anstieg im Proteingehalt. Behandlungen mit Aminosäuren-Analogen und mit 8-Azaguanin führen zu einer Abnahme des Protein-Gehaltes und, damit verbunden, zu einem Verbleiben im eindimensionalen Zustand.

Einen Schritt weiter führen die Untersuchungen von HAMERS (1956) an *Bacillus megatherium*. Thiouracil wird hier in die RNS eingebaut. Damit behandelte Bakterien-Kulturen wiesen ein lineares, unbehandelte dagegen ein logarithmisches Wachstum auf. Die Erklärung liegt nach HAMERS darin, daß die neu zu bildenden RNS-Systeme bei Behandlung ausfallen, die schon vor der Behandlung vorhandenen aber unangetastet bleiben.

Bei den Versuchen HAMERS waren die ausfallenden RNS-Systeme qualitativ gleicher Art wie die von der Behandlung nicht betroffenen, nämlich solche, die sich an Proteinsynthese und Wachstum der Bakterien beteiligten. Durch Thiouracil können aber auch qualitative Neubildungen selektiv verhindert werden, wie JEENER (1958) an einem lysogenen Stamm von *Bacillus megatherium* zeigen konnte. Durch Ribonuclease, Azaguanin und Thiouracil läßt sich die Lyse, d. h. die Phagenbildung, induzierter Bakterien verhindern, ohne daß das Wachstum der Bakterienkulturen wesentlich vermindert wird. Voraussetzung ist, daß man die 3 Inhibitoren zusetzt, bevor die Synthese des Phagenproteins begonnen hat.

Die Verhältnisse bei *Bacillus meg.* lassen sich mit denen bei *Streptocarpus* parallelisieren. Durch DNS im einen, durch die Induktionsbedingungen im anderen Fall werden die Zellen veranlaßt, spezifisches Phagenprotein bei *Bacillus meg.*, für die Blühinduktion spezifische RNS-Eiweiß-Systeme bei *Streptocarpus* zu bilden. Thiouracil stört den Aufbau der Systeme, bei *Bacillus meg.* unterbleibt die Bildung der Phagen, bei *Streptocarpus* die der Inflorescenzen. Das Wachstum der Bakterien und das von *Streptocarpus* verlaufen ungestört, da es auf schon vorhandenen RNS-Typen basiert. Die Wirkung von Thiouracil ist in beiden Fällen abgeschwächt oder aufgehoben, wenn es zu spät zugesetzt wird: bei *Bacillus meg.* nach Einsetzen der Phagen-Eiweiß-Synthese, bei *Streptocarpus* nach Beginn der Bildung des blüteninduzierenden Prinzips (in den letzten 4 Wochen der Induktion und nach der Induktion).

Daß Uracil ohne Wirkung bleibt, ist ohne weiteres verständlich. Eine Förderung der Nucleinsäure-Synthese wird dann ausbleiben, wenn der zugefügte Baustein in der Pflanze selbst in genügender Menge bereits vorhanden ist. So lassen sich die Befunde von SARKAR (1958) erklären, der durch RNS-Hydrolysate keine wesentliche Förderung der Vernalisation bei *Hyoscyamus* erreichen konnte.

3. Das Zusammenwirken des RNS-Eiweiß-Systems mit anderen Faktoren. Keineswegs sei behauptet, das nachgewiesene RNS-Eiweiß-System sei nun *das* „Blühhormon" schlechthin. Es ist ein Faktor unter anderen, dem allerdings eine spezifischere Wirkung zugesprochen werden muß.

a) DNS. Ob eine Wirkkette angenommen werden kann, die, von DNS ausgehend, über RNS-Eiweiß-Systeme zu den entsprechenden Leistungen führt, wie verschiedentlich nachgewiesen oder wahrscheinlichgemacht (Lit. MCELROY und GLASS 1957, BRACHET 1957, SCHRAMM 1958, BONNER 1959), muß noch dahingestellt bleiben.

b) Auxine. Für ein Zusammenwirken von Nucleinsäuren-Systemen und Auxinen bei Wachstum und Entwicklung höherer Pflanzen sprechen Untersuchungen von BER (1949) und HÖHN (1954/55). SKOOG befür-

wortet die Existenz solcher Auxin-Nucleinsäure-Systeme ebenfalls, die auch für die Adventivwurzel-Bildung in Betracht kommen (vgl. LIBBERT 1956). Ein Formbildungsphänomen, bei dem die endgültige Gestalt erst durch ein Ineinandergreifen von wuchsstoff- und nucleinsäureabhängigen Prozessen entsteht, ist die Bildung von Wurzelhalsgallen (KLEIN und LINK 1955, BRAUN und STONIER 1958, BOPP unveröffentlicht). In einer Vielzahl von Arbeiten ist die Beteiligung von Wuchsstoffen auch an den Vorgängen der Blühinduktion nachgewiesen worden (Lit. v. DENFFER 1950, LANG 1952, LIVERMANN 1955). Ein Zusammenwirken — welcher Art auch immer — zwischen Auxinen und Nucleinsäuren nicht erst während des Auswachsens der Inflorescenzen, sondern schon während der Induktion selbst muß in Betracht gezogen werden.

c) Gibberelline. Gibberelline scheinen in erster Linie Faktoren des Sproßwachstums zu sein (LANG 1957, TSCHAILACHJAN 1958). Sie sind weder mit „Florigen" noch mit „Vernalin" identisch (LANG 1957, SARKAR 1958, HESS 1959). Für Wechselwirkungen zwischen Gibberellinen und Nucleinsäuren ergeben sich verschiedene Möglichkeiten. Einmal kann durch Gibberelline der Stickstoffspiegel verändert werden (Lit. STOWE und YAMAKI 1957). Bei *Streptocarpus* sinkt nach Behandlung mit Gibberellin-Säure der Proteingehalt ab. Im gegebenen Zusammenhang liegt es nahe, in einem groben Defekt im RNS-Eiweiß-System die Ursache dafür zu sehen, daß bei *Streptocarpus* Gibberellin-Säure „Vernalin" nicht zu ersetzen vermag (HESS 1959). — Eine Beziehung zum Nucleinsäure-System ist nun auch über die Wuchsstoffe denkbar, denn Gibberellin-Säure scheint die Umwandlung von Tryptophan in β-Indolylessigsäure zu fördern. Die Gibberellin-Säure-Wirkung auf die Blütenbildung wäre also teilweise auf eine Auxin-Wirkung zurückzuführen (Lit. STOWE und YAMAKI 1957).

Die Befunde an *Streptocarpus* geben Hinweise darauf, daß sich an dem komplizierten Wechselspiel von Faktoren verschiedener Art, das letztlich zur Anlage der Inflorescenzen führt, auch RNS-Eiweiß-Systeme spezifischer Funktion beteiligen können. Durch Thiouracil läßt sich der Aufbau dieser Systeme selektiv blockieren, wodurch ihre Abgrenzung von den sonstigen RNS-Eiweiß-Systemen der Pflanze ermöglicht wird.

Zusammenfassung

1. Bei *Streptocarpus wendlandii* „München", einer unifoliaten Art, wird 2-Thiouracil-2-C^{14} in die RNS eingebaut.

2. Hohe Dosen von Thiouracil, die während der Induktionszeit gegeben wurden, hemmen die Blütenbildung und das Wachstum des Blattes im Anschluß an die Induktion.

3. Niedere Dosen von Thiouracil, die während der Induktionszeit gegeben wurden, stören das Wachstum des Blattes nach der Induktion

nicht. Dagegen wird die Anlage der Inflorescenzen verzögert oder gänzlich unterbunden.

4. Behandlungen mit Thiouracil, die sich über verschieden lange Abschnitte der Induktionszeit von insgesamt 8 Wochen erstreckten, zeigten, daß die gegen Thiouracil empfindlichen Vorgänge vor allem in der ersten Hälfte der Induktionsperiode stattfinden.

5. Nach der Induktionszeit konnte die Anlage der Inflorescenzen nur noch durch eine Überdosis von Thiouracil beeinflußt werden. Thiouracil in den bei 3. verwandten Konzentrationen bleibt auf die Anlage der Inflorescenzen ohne Wirkung. Dagegen wird die weitere Entwicklung der Blütenstände gestört. Die ersten Inflorescenzen wachsen langsamer heran und weisen einen hohen Prozentsatz abnormer Blüten auf.

6. Die Thiouracil-Effekte können durch Uracil bei Anwendung niederer Thiouracil-Konzentrationen völlig, bei Anwendung höherer Thiouracil-Dosen teilweise aufgehoben werden.

7. Sieben Wochen nach Abschluß der Induktion wurden erstmals das Trockengewicht, der Gesamt- und Protein-N sowie das RNS- und DNS-P bestimmt. Hohe Thiouracil-Dosen (vgl. 2.) führen einen Defekt im RNS-Eiweiß-System herbei. Bei Anwendung niederer Thiouracil-Dosen (vgl. 3.) ist kein chemischer Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Pflanzen feststellbar.

Wie entsprechende Analysen zeigten, sind 13 Wochen nach der Induktion im Zusammenhang mit dem Auswachsen der Inflorescenzen sekundäre Veränderungen eingetreten. In mit Thiouracil behandelten Versuchsserien wurden blühende und blühgehemmte Pflanzen miteinander verglichen. Alle blühgehemmten Exemplare haben den Zustand gänzlich unbehandelter vegetativer Kontrollen angenommen, und zwar durch eine Vermehrung des RNS- und DNS-Gehaltes gegenüber blühenden Pflanzen der gleichen Serie.

Die chemischen Analysen zeigen somit, daß die Thiouracil-Wirkungen auf die Anlage der Inflorescenzen nicht Folge einer groben Schädigung des Gesamt-RNS-Eiweiß-Systems der Pflanze sein können.

8. Die experimentellen Daten werden durch selektive Blockierung eines RNS-Eiweiß-Systems erklärt, das nur einen Bruchteil des gesamten RNS-Eiweiß-Systems der Zelle ausmacht und im Zusammenspiel mit anderen Faktoren den Erfolg der Blühinduktion bestimmt. Thiouracil stört den Aufbau dieses Systems während der Induktionszeit. Die in den Zellen zum Zeitpunkt der Induktion bereits vorhandenen RNS-Eiweiß-Systeme werden von einer entsprechend abgestimmten Thiouracil-Behandlung nicht betroffen. Infolgedessen kann das vegetative Wachstum im Anschluß an die Induktion ungehindert einsetzen und ablaufen.

Literatur

Aach, H. G., u. G. Melchers: Serologische Untersuchungen an kältebedürftigen Pflanzen. Biol. Zbl. **76**, 466—475 (1957). — Ber, A.: Auxine und Nucleinsäuren. Experientia (Basel) **5**, 455—460 (1949). — Böttger, I., u. R. Wollgiehn: Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsel in grünen Blättern höherer Pflanzen. Flora (Jena) **146**, 302—320 (1958). — Bonner, J.: Protein synthesis and the control of plant processes. Amer. J. Bot. **46**, 58—62 (1959). — Brachet, J.: The biological role of the pentose nucleic acids. In E. Chargaff and J. N. Davidson, The nucleic acids, vol. 2. New York: Academic Press 1955. — Biochemical cytology. New York: Academic Press 1957. — Braun, A. C., and T. Stonier: Morphology and physiology of plant tumors. In L. V. Heilbrunn u. F. Weber, Protoplasmatologia, Bd. 10, 5a. Wien: Springer 1958. — Caputto, R., L. F. Leloir, C. E. Cardini and A. C. Paladini: Isolation of the coenzyme of the galactose phosphate-glucose phosphate transformation. J. biol. Chem. **184**, 333—350 (1950). — Cardini, C. E., A. C. Paladini, R. Caputto and L. F. Leloir: Uridine diphosphate glucose: the coenzyme of the galactose-glucose phosphate isomerisation. Nature (Lond.) **165**, 191—192 (1950). — Chargaff, E., and J. N. Davidson: The nucleic acids, vol. 1 and 2. New York: Academic Press 1955. — Denffer, D. v.: Blühhormon oder Blühhemmung? Neue Gesichtspunkte zur Physiologie der Blütenbildung. Naturwiss. **37**, 296—301, 317—321 (1950). — Fraenkel-Conrat, H., B. H. Singer and R. C. Williams: The nature of the progeny of virus reconstituted from protein and nucleic acid of different strains of tobacco mosaic virus. In W. D. McElroy and B. Glass, The chemical basis of heredity. Baltimore: John Hopkins Press 1957. — Gierer, A., u. G. Schramm: Die Infektiosität der Nucleinsäure aus Tabakmosaikvirus. Z. Naturforsch. **11b**, 138—142 (1956). — Hamers, R.: Incorporation of ^{35}S-thiouracil in *Bacillus megatherium*. Biochem. biophys. Acta **21**, 170—171 (1956). — Hess, D.: Die Regulatoren des Streckungswachstums bei *Streptocarpus Wendlandii* Utrecht und ihre Veränderungen während der Blühinduktion. Planta (Berl.) **50**, 504—525 (1958). — Die Wirkung von Gibberellinsäure auf Entwicklung, Stickstoff- und Nucleinsäure-Gehalt von *Streptocarpus Wendlandii*. Naturwiss. **46**, 408—409 (1959). — Höhn, K.: Die Bedeutung der Nucleinsäuren für embryonale und postembryonale Wachstumsvorgänge der Pflanze. Naturwiss. **41**, 536 (1954). — Zur Frage der Bedeutung der Nucleinsäuren für die Wachstumsvorgänge der Pflanzen. Beitr. Biol. Pflanz. **31**, 261—292 (1955). — Holden, M.: The fractionation and enzymic breakdown of some phosphorus compounds in leaf tissue. Biochem. J. **51**, 433—442 (1952). — Hotchkiss, R. D.: The biological role of the deoxypentose nucleic acids. In E. Chargaff and J. N. Davidson, The nucleic acids, vol. 2. New York: Academic Press 1955. — Hotta, Y., and S. Osawa: Control of differentiation in the fern gametophyte by amino acid analogs and 8-azaguanine. Exp. Cell Res. **15**, 85—94 (1957). — Jeener, R.: The action of ribonuclease, thiouracil and azaguanine on the synthesis of phage proteins by an induced lysogenic bacterium. Biochim. biophys. Acta **27**, 665 (1958). — Jeener, R., and J. Rosseels: Incorporation of 2-thiouracil-^{35}S in the ribose nucleic acid of tobacco mosaic virus. Biochim. biophys. Acta **11**, 438 (1953). — Kalckar, H. M.: The enzymes of uridine polyphosphates. Science **119**, 479—480 (1954). — Kessler, B.: Effect of methyltryptophane and thiouracil upon protein and ribonucleic-acid synthesis in certain higher plants. Nature (Lond.) **178**, 1337—1338 (1956). — Klein, R. M., and G. K. K. Link: The etiology of crown-gall. Quart. Rev. Biol. **30**, 207—277 (1955). — Lang, A.: Physiology of flowering. Ann. Rev. Plant Physiol. **3**, 265—306 (1952). — Entwicklungsphysiologie. Fortschr. Bot. **19**, 356—384 (1957). — The effect of gibberellin

lupon flower formation. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **43**, 709—717 (1957). — Libbert, E.: Die hormonale und korrelative Steuerung der Adventivwurzelbildung. Wiss. Z. Humboldt-Univ. Berlin **6**, 315—347 (1956/57). — Linskens, H. F.: Papierchromatographie in der Botanik. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959. — Livermann, J. L.: The physiology of flowering. Ann. Rev. Plant Physiol. **6**, 177—210 (1955). — Mandel, H. G., R. Markham and R. E. F. Matthews: The distribution of thiouracil in nucleic acid of tobacco mosaic virus. Biochim. biophys. Acta **24**, 205—206 (1957). — Markham, R.: Nucleic acids, their components and related compounds. In K. Paech u. M. V. Tracey, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. 4. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — Matthews, R. E. F.: Thiouracil in tobacco mosaic virus. Biochim. biophys. Acta **19**, 559 (1956). — McElroy, W. D., and B. Glass: A symposium on the chemical basis of heredity. Baltimore: John Hopkins Press 1957. — Melchers, G.: The physiology of flower-initiation. Dokumentationsstelle der Max-Planck-Ges., Göttingen 1952. — Michelson, A. M.: A hypothesis for the biosynthesis of ribonucleic acid and protein. Nature (Lond.) **181**, 375—377 (1958). — Oehlkers, F.: Bastardierungsversuche in der Gattung *Streptocarpus* Lindl. 1. Plasmatische Vererbung und die Geschlechtsbestimmung von Zwitterpflanzen. Z. Bot. **32**, 305 bis 393 (1938). — Blattstecklinge als Indikatoren für blütenbildende Substanzen. Z. Naturforsch. **10b**, 158—160 (1955). — Veränderungen in der Blühbereitschaft vernalisierter Cotyledonen von *Streptocarpus*, kenntlichgemacht durch Blattstecklinge. Z. Naturforsch. **11b**, 471—480 (1956). — Ogur, M., and G. Rosen: The nucleic acids of plant tissues. 1. The extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. Arch. Biochem. **25**, 262—276 (1950). — Pohl, R.: 25 Jahre Wuchsstofforschung. Naturwiss. **41**, 392—400, 414—419 (1954). — Resende, F., and M. J. Viana: Some effects of synthetic auxins and antiauxins on the floral state. Bol. Soc. portug. Ci. nat. **4**, 74—78 (1952). — Sarkar, S.: Versuche zur Physiologie der Vernalisation. Biol. Zbl. **77**, 1—49 (1958). — Schmitz, H., R. B. Hurlbert and R. van Potter: Nucleotide metabolism. 3. Mono-, di- and triphosphates of cytidine, guanosine and uridine. J. biol. Chem. **209**, 41—54 (1954). — Schramm, G.: Die Biochemie der Viren. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954. — Die identische Reproduktion der Proteine. In W. Ruhland, Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 8. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958. — Simkin, J. L., and T. S. Work: Protein synthesis as part of the problem of biological replication. Symp. Soc. exp. Biol. **12**, 164—175 (1958). — Stowe, B. R., and T. Yamaki: The history and physiological action of the gibberellins. Ann. Rev. Plant Physiol. **8**, 181—210 (1957). — Thomas, A. J., and H. S. A. Sherratt: The isolation of nucleic acid fractions from plant leaves and their purine and pyrimidine composition. Biochem. J. **62**, 1—4 (1956).

Dr. D. Hess,
Botanisches Institut der Universität Freiburg i. Br., Schänzlestr. 9

Planta 54, 95—106 (1959)

Aus dem Botanischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover
und dem Botanischen Institut der Universität Würzburg

BEOBACHTUNGEN ZUR PHOTOSYNTHESE-PHOSPHORYLIERUNG ISOLIERTER CHLOROPLASTEN*

Von

W. SIMONIS und W. FÜCHTBAUER

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. Juli 1959)

Die Entdeckung der Photosynthese-Phosphorylierung durch isolierte Chloroplasten (ARNON, ALLEN und WHATLEY 1954) legte zusammen mit den Arbeiten des einen von uns über die lichtabhängige Phosphorylierung bei *Helodea* und Algen (SIMONIS u. Mitarb. 1953—1958) einen Vergleich der Befunde bei ganzen, unzerstörten Chloroplasten einerseits und bei intakten Pflanzen andererseits nahe. Der Ausgangspunkt war die Frage, wie sich die Phosphorylierungs-Geschwindigkeit von isolierten *Helodea*-Chloroplasten von der intakter *Helodea*-Blätter unterscheidet. An die Experimente hierzu schloß sich eine Reihe von Beobachtungen an, die ebenso wie einige methodische Gesichtspunkte hier dargestellt werden sollen, weil sie die Grundlage für weitere in anderem Zusammenhang begonnene Untersuchungen bilden.

Material und Methoden

Die Chloroplasten wurden — abgesehen von den Versuchen mit anderen Pflanzen — aus *Spinat* (Sorte „Matador") isoliert, der im Freien oder in Frühbeeten angezogen war. In den Sommermonaten wurde wegen der kurzen Zeitspanne bis zum Blühen in dieser Jahreszeit alle 3 Wochen neuer Spinat angesät. Im Winter kultivierten wir den Spinat im Gewächshaus und steigerten seine Wachstumsgeschwindigkeit durch Belichtung.

Zur Chloroplasten-Isolierung wendeten wir die von ARNON, ALLEN und WHATLEY (1956) beschriebene Methode an, bei der die Spinatblätter mit 0,35 m NaCl-Lösung und Seesand im Mörser zerrieben werden und das Filtrat des entstandenen Breies fraktioniert zentrifugiert wird. Wir hatten festgestellt, daß beim Homogenisieren der Blätter die Chlorophyllkörner größtenteils zerschlagen werden; daher ist das Mörsern bei weitem vorzuziehen. Um die Chloroplastenfraktion so weit wie möglich von kleineren Bestandteilen (Chloroplastenfragmente, Mitochondrien, Zellwandsplitter usw.) freizuhalten, wurde mit niedrigerer Umdrehungsgeschwindigkeit als bei ARNON et al. angegeben zentrifugiert: Zunächst wurden die gröberen Bestandteile 1 min mit 200 g abzentrifugiert, dann wurde das Überstehende 7 min bei 600 g zentrifugiert, das Sediment wieder aufgeschwemmt und erneut 7 min bei 600 g zentrifugiert. Nach dieser Prozedur enthielten unsere Fraktionen fast keine

* Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. RICHARD HARDER in Dankbarkeit und Verehrung gewidmet.

Chloroplasten-Fragmente oder Mitochondrien mehr. Mörser, Sand und Zentrifugengläser kühlten wir auf -10^0 C vor, die Kochsalzlösung auf 0^0; dadurch erreichten wir eine Temperatur des Gemisches während der Isolierungsprozedur von 0—5^0 C.

Die *Hill-Reaktion* wurde als Sauerstoffabgabe gemessen, entweder nach Warburg (1952) in Gegenwart von Chinon (0,05% + 0,05% KCl) oder nach Hill (1951) mit Ferricyanid [in 6 ml Reaktionslösung 30 μMole $K_3Fe(CN)_6$, 70 μMole NaCl und 140 μMole Trispuffer, pH 7,2].

Die *Photosynthese-Phosphorylierung* wurde im wesentlichen wie bei Arnon u. Mitarb. im Warburg-Apparat bei 15—16^0 C durchgeführt. Als Lichtquelle dienten Leuchtstoffröhren von Osram, Type HNI de Luxe (Ruge 1958); die Beleuchtungsstärke betrug 4300 Lux am Boden der Reaktionsgefäße. Die Gefäße enthielten 3 ml Reaktionslösung mit unterschiedlichen Mengen Chloroplasten (0,05—1 mg Chlorophyll pro Gefäß). Wir gaben das gesamte Phosphat (pro Gefäß 10—20 μMole ^{31}P als Puffergemisch und 20—30 μCurie ^{32}P) bei Versuchsbeginn aus der Ansatzbirne zu. Da der P-Gehalt der Chloroplasten — etwa 2 μMole pro mg Chlorophyll — klein ist, verglichen mit der Menge des zugegebenen P, bleibt die spezifische Aktivität konstant und ist in allen Fraktionen die gleiche. Es können also keine Störeffekte durch Nebenreaktionen des schon in den Chloroplasten vorhandenen P auftreten. Die Reaktionslösung und der Phosphatpuffer wurden auf pH 7,9 oder 8,1 eingestellt. Als Substrat für die Phosphorylierung dienten Adenosin-5-mono- oder -diphosphat (AMP oder ADP, 10—20 μMole pro Gefäß). Die Gefäße enthielten in μMolen pro 3 ml Reaktionslösung: Trispuffer 50; $MgCl_2$ 10; Na-Ascorbat 10; Flavin-Mononucleotid 0,1; Vitamin K_3 0,3 (gelöst in 0,05 ml Methanol); KCl 840; NaCl 210. Die Reaktionslösung wurde jeweils am Versuchstag frisch angesetzt. Vor dem Versuch wurden die Gefäße mit nachgereinigtem Stickstoff durchgast. Auch wir hatten, wie Arnon, Whatley und Allen (1954), gefunden, daß in einer N_2-Atmosphäre eine höhere Phosphorylierung zu erzielen ist als bei Sauerstoff-Gegenwart. Zur Kontrolle ließen wir immer einige Dunkel-Gefäße (aufgerauhte Warburg-Gefäße, die mit Chlorkautschuklack lackiert waren) mitlaufen. Auch in diesen Gefäßen findet eine Phosphorylierung statt (s. Abb. 3!), die zwar, verglichen mit der Reaktion im Licht, gering ist, aber doch bei einer Reaktionsdauer von 1 Std etwa 3mal so hoch ist wie der Nullwert, den wir mit *gekochten* Chloroplasten erhielten.

Die Reaktion wurde zu dem gewünschten Zeitpunkt, nach 10 min bis 1 Std, beendet durch Zugabe von Trichloressigsäure (TES), Endkonzentration 4%; dann wurde die Aktivität des TES-löslichen organischen Phosphats gemessen (Methode s. bei Grube 1953). Die gebildeten markierten organischen Phosphate wurden außerdem durch Papierchromatographie und Autoradiographie (zur Methode s. Schwinck 1956) nachgewiesen; dabei benutzten wir die bei Simonis, Kating und Kues (1957) beschriebenen Laufmittel. Die quantitative Auswertung eindimensionaler Chromatogramme erfolgte mittels des Radiopapierchromatographen FH 452 (Frieseke und Höpfner) in Verbindung mit einem Metrawatt-Linienschreiber.

Den *Chlorophyllgehalt* der Chloroplastenfraktionen bestimmten wir unter Benutzung eines Zeiss-Spektralphotometers nach der Methode von Mackinney (1941) und Arnon (1949).

Versuche

1. Versuche zur Wahl des Pflanzenmaterials. Da wir von den erwähnten Untersuchungen mit *Helodea densa* (vgl. besonders Weichart 1958) ausgehen wollten, haben wir auch mit dieser und anderen Pflanzen (*Sambucus*

racemosa, *Tradescantia zebrina*, *Cineraria hybrida*, *Tetragonia expansa* und *Valerianella olitoria*) Fraktionen von unzerstörten Chloroplasten gewonnen, konnten aber bisher mit keiner dieser Fraktionen eine lichtabhängige Phosphorylierung erzielen, auch dann nicht, wenn mit den gleichen Chloroplasten (z.B. von *Tradescantia*) die Hill-Reaktion normal ablief. Man könnte nun vermuten, daß die Spinat-Chloroplasten einen Stoff enthalten, der die Phosphorylierungs-Reaktion ermöglicht und der den anderen Pflanzen fehlt. Wenn dieser Stoff extrahierbar ist, dann muß ein Extrakt, zu Chloroplasten anderer Pflanzen zugesetzt, diese zur Reaktion bringen. Wir machten daher aus normal hergestellten, aber ungewaschenen Spinat-Chloroplasten wäßrige Extrakte mit zwei verschiedenen Methoden:

1. Die Chloroplasten wurden am Tag vor dem Versuch hergestellt, in Aqua dest. suspendiert, bei -10^0 eingefroren, am Versuchstag aufgetaut, 2 Std bei Zimmertemperatur stehengelassen und bei 25000 g 10 min abzentrifugiert. Das Überstehende wurde als Extrakt genommen.

2. Extrakt nach Avron, Jagendorf und Evans (1957): Die Chloroplasten wurden in 0,05 m Trispuffer, p_H 8, suspendiert, 1 Std bei 0^0 stehengelassen, dann 10 min mit 25000 g bei 0^0 abzentrifugiert; das Überstehende ist der Extrakt.

0,7 ml dieser Extrakte setzten wir dem Reaktionsgemisch mit *Tradescantia*-Chloroplasten zu, konnten aber mit keinem der Extrakte eine Wirkung erzielen.

Wenn andererseits die Chloroplasten der genannten anderen Pflanzen einen Stoff enthalten, der die Photosynthese-Phosphorylierung isolierter Chloroplasten hemmt und den der Spinat nicht enthält, dann muß ein Extrakt von Chloroplasten dieser Pflanzen, den Spinat-Chloroplasten zugesetzt, deren Photosynthese-Phosphorylierung hemmen. Tatsächlich fanden wir durch Zugabe von *Tradescantia*-Extrakten, die nach den beiden Methoden hergestellt waren, eine Depression der Phosphorylierungs-Geschwindigkeit der Spinat-Chloroplasten um 20%, jedoch erhielten wir dieselbe Depression auch durch Zugabe von Spinat-Chloroplasten-Extrakten, die aus der gleichen Chloroplasten- (Chlorophyll-) Menge mit den beiden Methoden hergestellt waren (weiteres hierzu s. unten). Es handelt sich also nicht um einen spezifischen, nur dem Spinat fehlenden Hemmstoff.

Da Spinat bekanntlich reich an Salzen ist, besonders an Eisen, versuchten wir, mit Zusatz von Fe^{II}, Fe^{III}, $Fe^{II} + Fe^{III}$, Mn^{II} oder Zn^{II} bei *Tradescantia*-Chloroplasten eine Photosynthese-Phosphorylierung hervorzurufen. Auch diese Versuche blieben ohne Erfolg. Ebensowenig reagierten *Tradescantia*-Chloroplasten auf einen Zusatz von Oxalsäure, die ebenfalls in Spinat-Chloroplasten reichlich vorhanden ist (Warburg 1958). Auch beim Spinat war nicht in jedem Falle eine

Phosphorylierung zu erzielen; diese hängt nämlich stark vom Zustand der Blätter ab: mit gekauftem, d.h. nicht frisch geerntetem Spinat war keine oder nur eine sehr schwache Phosphorylierung festzustellen; ebenso reagierten Chloroplasten aus sehr welken oder im Winter im Freien geernteten Blättern nicht.

2. Wirkung von Chloroplasten-Extrakten. Wie oben mitgeteilt, stellten wir fest, daß ein wäßriger Extrakt von Spinat-Chloroplasten, ganzen Chloroplasten zugesetzt, deren Phosphorylierungs-Reaktion hemmt. Da Avron, Jagendorf und Evans (1957) das Gegenteil gefunden haben, prüften wir diesen Effekt nach mit Extrakten, die genauso hergestellt waren wie die der genannten Autoren. Wir fanden in den meisten Fällen eine konzentrationsabhängige Hemmung (Abb. 1). Die höchste Konzentration in Abb. 1 ist die von Avron u. Mitarb. für ihre Extrakte angegebene Konzentration: aus 25 g Blättern (die bei uns Chloroplasten mit etwa 6 mg Chlorophyll ergaben) wurden 3 ml Extrakt gewonnen; 0,7 ml Extrakt waren in 3 ml Reaktions-Lösung enthalten. Wird der Extrakt kurze Zeit auf 100° erhitzt, so ist die Hemmwirkung die gleiche; es handelt sich also offenbar nicht um eine fermentative Hemmung. Wir erhielten die Hemmung auch dann, wenn wir die Salzkonzentration der Reaktionslösung (normalerweise 0,35 m) auf $^1/_4$ erniedrigten. (Dies hatte sonst keinen Einfluß auf die Phosphorylierungs-Geschwindigkeit.) Eine osmotische Hemmung lag also nicht vor. In keinem Falle erhielten wir eine *Förderung* der Phosphorylierung durch Extraktzusatz, wenn der Extrakt klar war, also keine Chloroplasten oder Chloroplastenfragmente mehr enthielt.

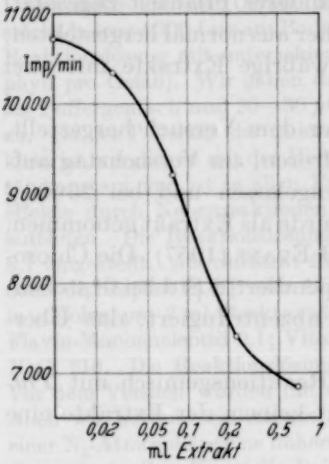


Abb. 1. Photosynthese-Phosphorylierung in Abhängigkeit vom Zusatz eines Chloroplasten-Extraktes. Näheres s. Text

3. Die Geschwindigkeit der Phosphorylierungs-Reaktion. Optimale Bedingungen für die Phosphorylierungs-Geschwindigkeit erreichten wir durch niedrige Chloroplasten-Konzentrationen [wir konnten die Angaben von Allen, Whatley und Arnon (1958) bestätigen, daß 0,05—0,2 mg Chlorophyll pro 3 ml Reaktionslösung optimal sind] und dadurch, daß wir bei der Chloroplasten-Herstellung sehr sorgfältig auf die Temperatur achteten: Vom Zermörsern der Blätter bis zum Reaktionsbeginn befanden sich die Chloroplasten 50 min bei 0—5° und 10 min bei 15—16°. Unter diesen Bedingungen fanden wir Phosphorylierungs-Geschwindigkeiten von 40—55 μMolen/Std/mg Chlorophyll.

(Dabei ist auch hier die Phosphorylierung nicht als verschwundenes anorganisches Phosphat gemessen, sondern als gebildetes TES-lösliches P, also entstandene ADP und ATP.) Diese Werte stimmen größenordnungsmäßig mit den Angaben von WESSELS (1957, 1958) überein. Da aber ALLEN u. Mitarb. weit höhere Phosphorylierungsraten mit Chloroplasten-„Fragmenten" erzielt haben, d. h. Chloroplasten, die mit 0,035 m NaCl-Lösung vorbehandelt waren, untersuchten wir den Einfluß dieser Behandlung auf die Phosphorylierungs-Geschwindigkeit. Schwemmt man normal hergestellte Chloroplasten in 0,035 m NaCl-Lösung auf, so bleibt nach unseren Erfahrungen ein großer Teil der Chloroplasten unzerstört; sie quellen nur auf. Nur bei einem kleineren Teil ist die Außenmembran geplatzt, so daß ein Teil der Grana austritt. Erst wenn man die in 0,035 m NaCl aufgeschwemmten Chloroplasten abzentrifugiert und erneut im gleichen Medium aufschwemmt, sind die meisten Chloroplasten zerstört, obgleich sich auch hier die Grana noch z.T. im Chloroplastenverband befinden. Wir konnten weder mit den nur in 0,035 m NaCl aufgeschwemmten noch mit den nochmals im gleichen Medium gewaschenen Chloroplasten höhere Phosphorylierungsraten als mit ganzen Chloroplasten erzielen. Im Gegenteil fanden wir, daß die zerstörten Chloroplasten eine niedrigere Pbosphorylierungs-Geschwindigkeit hatten als die heilen (Tabelle 1). Außerdem zeigt die Tabelle, daß jedes weitere Waschen die Phosphorylierungsrate herabsetzt.

Tabelle 1. *Phosphorylierungsrate von Chloroplasten, die mit hypotonischem Medium behandelt sind*

	μMole P/mg Chlorophyll/ Stunde
Ganze Chloroplasten	43
Zerstörte Chloroplasten	34
Zerstörte Chloroplasten 1mal gewaschen . .	23
Zerstörte Chloroplasten 2mal gewaschen . .	19

Chloroplastenkonzentration: Überall 0,1 mg Chlorophyll pro Gefäß.

Ganze Chloroplasten: Normale Herstellung, also gewaschen in0,35 m NaCl.

Zerstörte Chloroplasten: Normale Herstellung, aber nach Waschen in 0,35 m NaCl aufgeschwemmt in 0,035 m NaCl.

Zerstörte Chloroplasten, gewaschen: Die zerstörten Chloroplasten nochmals abzentrifugiert (10 min mit 20000 g) und wieder aufgeschwemmt in 0,035 m NaCl.

Andererseits scheint unser Chloroplastenmaterial aber durchaus nicht geschädigt zu sein; denn wir fanden (in Übereinstimmung mit den früheren Angaben von ARNON, WHATLEY und ALLEN 1954) nur eine geringe Abnahme der Phosphorylierungs-Geschwindigkeit in dem untersuchten Zeitraum, z.B. in der Zeit von 70—190 min nach dem Zermörsern der Blätter (Abb. 2). Rechnet man den nach 5 min erhaltenen Wert (Abb. 2) auf 1 Std um, so ergeben sich 69, bei dem Wert zwischen 1 und 2 Std 38 μMole P/Std/mg Chlorophyll.

Da Algen durch wiederholtes Zentrifugieren geschädigt werden, testeten wir *unzentrifugierte* Chloroplasten auf ihre Phosphorylierungs-Aktivität. Wir benutzten dazu das Überstehende nach dem ersten Zentrifugieren (mit 200 g) bei der normalen Chloroplastenherstellung. Die Reaktionsgeschwindigkeit, bezogen auf den Chlorophyllgehalt, lag etwa um 40% *unter* der von normal hergestellten Chloroplasten. Der Grund hierfür liegt wohl in dem relativ hohen Anteil von nicht reaktionsfähigen Chloroplasten-Fragmenten — ein weiterer Hinweis dafür, daß bei uns die Chloroplasten-Fragmente nicht reaktionsfähiger sind als die ganzen Chloroplasten.

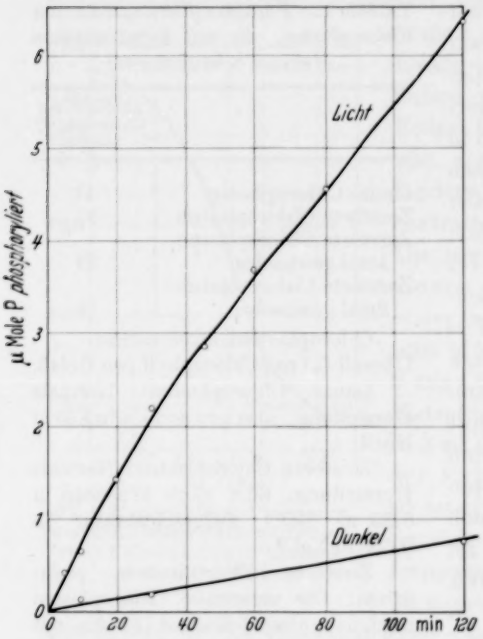


Abb. 2. Photosynthese-Phosphorylierung von ADP durch ganze Chloroplasten. Chloroplastenkonzentration: 0,07 mg Chlorophyll pro Gefäß. Zermörsern der Blätter 70 min vor Reaktionsbeginn

4. Reaktionsprodukte der Phosphorylierung. Die von den TES-Extrakten hergestellten Radioautogramme zeigten bei unserer Versuchsanordnung (AMP oder ADP als Substrat) an markierten Phosphaten ganz überwiegend ADP und ATP (Abb. 3). Dabei stimmten die Verhältnisse der Aktivitäten der durch Papierchromatographie der Extrakte aus den einzelnen Reaktionsgefäßen erhaltenen Nucleotidflecke ohne eine Ausnahme genau überein mit den relativen Werten des aus den gleichen Extrakten gewonnenen TES-löslichen organischen Phosphats. In weit geringerem Maße wurden noch einige andere Phosphate markiert, von denen Glucose-6-Phosphat identifiziert werden konnte.

5. Verbleib der gebildeten ATP. Wenn man nach der Reaktion die Chloroplasten abzentrifugiert und dann diese und das Überstehende *getrennt* mit TES versetzt, dann findet man den allergrößten Teil des TES-löslichen organischen Phosphats im Überstehenden; jedoch enthielten die Chloroplasten auch nach Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung noch geringe Mengen markierter ATP, wie papierchromatographisch nachgewiesen werden konnte. Berechnet man die Menge an ATP, die man im Chloroplasten-Sediment finden würde, wenn

sich die ATP gleichmäßig innerhalb und außerhalb der Chloroplasten verteilen würde, so kommt man auf einen Wert, der nur um weniges kleiner ist als der von uns gefundene. Die Konzentration der ATP ist also in den Chloroplasten nicht viel größer als in der Außenlösung,

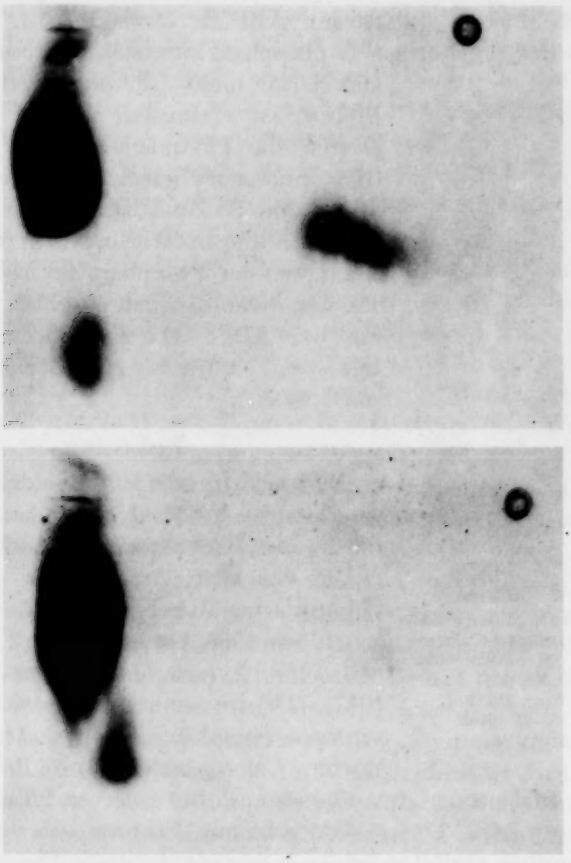


Abb. 3. Radioautogramm vom TES-Extrakt isolierter Chloroplasten nach Reaktion mit ADP, Markierung mit ^{32}P. Starke ATP-Bildung nur im Licht (oben). Unten Dunkel. Lösungsmittelgemisch der 1. Laufrichtung nach ALBAUM, der 2. Laufrichtung nach MORTIMER, s. Methoden

d.h., die in den Chloroplasten enthaltene ATP akkumuliert unter diesen Versuchsbedingungen dort nicht, sondern diffundiert ohne weiteres nach außen. Die Chloroplastenmembran ist also offenbar für die ATP völlig permeabel.

6. Andere Nucleotide als Substrate. Wir haben außer AMP und ADP auch andere Ribonucleotide als Substrate für die Phosphorylierung benutzt, und zwar die 5-Mono- und -Diphosphate von Inosin, Guanosin

und Uridin. Die Mittelwerte der Ergebnisse mehrerer Versuche sind aus Tabelle 2 zu ersehen.

Die Zahlen geben an, welcher Anteil des angebotenen anorganischen Phosphats nach 1 Std Reaktion durch Phosphorylierung des betreffenden Substrates in organisches Phosphat überführt worden ist. Man sieht, daß von den Monophosphaten nur AMP zu verwenden ist. Auch wenn wir Spuren der zugehörigen Triphosphate zusetzten, wurden IMP, GMP und UMP nicht phosphoryliert. Von den Diphosphaten dagegen können die Chloroplasten die Purinderivate ADP, IDP und GDP phosphorylieren. Zum Beispiel zeigt Abb. 4 im Radioautogramm das im Licht gebildete Inosin-Triphosphat. Die p_H-Abhängigkeit der Phosphorylierung ist bei IDP, das wir daraufhin untersuchten, die gleiche wie bei ADP: Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt stetig an mit Zunahme des p_H von 7,3—8,3.

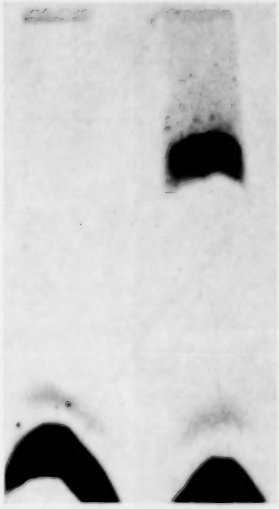


Abb. 4. Radioautogramm vom TES-Extrakt isolierter Chloroplasten nach Reaktion mit IDP. Im Licht (rechts) ITP-Bildung. Links Dunkel. Lösungsmittelgemisch nach Albaum

Diskussion

Während für die Hill-Reaktion schon die verschiedensten Pflanzen benutzt worden sind, wurde die Photosynthese-Phosphorylierung bisher von allen Autoren nur mit Spinat-Chloroplasten durchgeführt (Arnon u. Mitarb. 1954—1958, Ohmura 1955, Wessels 1957 und 1958, Avron, Jagendorf und Evans 1957). Da wir annehmen, daß die Photosynthese-Phosphorylierung isolierter, unzerstörter Chloroplasten eine Reaktion von allgemeiner Bedeutung ist, müßte sie auch bei anderem Pflanzenmaterial durchzuführen sein. Unsere Versuche mit Pflanzen aus verschiedenen anderen Familien verliefen jedoch bisher ergebnislos[1]. Die von mehreren

Tabelle 2. *Phosphorylierung verschiedener Nucleotide* (Erläuterung im Text)

	Substrat							
	AMP	IMP	GMP	UMP	ADP	IDP	GDP	UDP
% phosphoryliert . .	36	0	0,2	0,1	30	20	17	0,4

[1] Neuerdings haben Whatley, Allen, Trebst und Arnon (1958) auch bei Chloroplastenfraktionen anderer Pflanzen als Spinat eine Photosynthese-Phosphorylierung gefunden, wenn sie, soweit wir sehen, zerstörte Chloroplasten

Autoren (WHATLEY u. Mitarb. 1956, AVRON und JAGENDORF 1957, CHOW und VENNESLAND 1957) gefundene Wirksamkeit von Chloroplasten-Extrakten ließ uns vermuten, daß auch hier ein Zusatz von Spinatchloroplasten-Extrakten die Chloroplasten der anderen Pflanzen mit den notwendigen Cofaktoren versorgen würde. Dies war jedoch nicht der Fall, sondern wir stellten im Gegenteil eine Hemmwirkung von solchen Extrakten fest. Dieser Effekt steht im Gegensatz zu dem Befund von AVRON, JAGENDORF und EVANS (1957), die die Phosphorylierungs-Geschwindigkeit ganzer Chloroplasten durch Zusatz eines Chloroplasten-Extraktes wesentlich steigern konnten. Diese Diskrepanz ist schwer zu verstehen, zumal sie so erheblich ist, daß kleine Unterschiede in der Herstellungsweise des Extraktes, die unvermeidlich sind, für eine Erklärung nicht ausreichen.

Die Geschwindigkeit der Phosphorylierungs-Reaktion ist in der letzten Zeit stark beachtet worden. Sie hängt außer von der Gegenwart von Cofaktoren (zur Wirkung von Ascorbinsäure auf die anaerobe Photosynthese-Phosphorylierung s. FÜCHTBAUER und SIMONIS 1958) stark vom Zustand des Blattmaterials und der Chloroplasten ab. Unsere Werte (40—70 μMole P/mg Chlorophyll/Std) stimmen größenordnungsmäßig überein mit den Angaben von WESSELS (1957 und 1958), ferner mit den Werten, die AVRON, JAGENDORF und EVANS (1957) sowie JAGENDORF und AVRON (1958, Tabelle 1) ohne Extraktzusatz erhielten. Weit höhere Phosphorylierungsraten werden berichtet einerseits von JAGENDORF und AVRON (1958) bei Zusatz von nicht physiologischen Cofaktoren und andererseits von ALLEN, WHATLEY und ARNON (1958); bei diesen Autoren traten die hohen Raten allerdings nur bei Verwendung von Chloroplasten-„Fragmenten" auf, d. h. Chloroplasten, die mit 0,035 m NaCl-Lösung vorbehandelt waren. Nach unseren Erfahrungen bewirkt diese Behandlung nur bei einem kleinen Teil der Chloroplasten eine Zerstörung in dem Sinne, daß die Grana aus dem Organell austreten. Man könnte sich vorstellen, daß die so gequollenen Chloroplasten eine größere Permeabilität haben, daß also mehr Phosphat pro Zeiteinheit in die Chloroplasten gelangen kann und dadurch die Reaktionsgeschwindigkeit gesteigert wird. Doch kann man aus den Versuchen über den Verbleib der gebildeten ATP schließen, daß selbst die unbeschädigten Chloroplasten sogar für ATP völlig permeabel sind. Eine weitgehende Permeabilität der Chloroplastenmembran geht auch aus dem Befund von STOCKING (1959) hervor, daß sich nach ebenso wie bei uns vorgenommener Isolierung der Chloroplasten 90% der Phosphorylase im Überstehenden befindet. Erst bei nochmaligem

+ Chloroplasten-Extrakt verwendeten und außerdem TPN zusetzten. Eine ATP-Bildung ohne gleichzeitige TPN-Reduktion, wie sie hier untersucht wurde, ist also bisher nur bei Spinat nachgewiesen.

Waschen in hypotonischem Medium sind die meisten Chloroplasten zerstört; hier könnte die vergrößerte Oberfläche eine Steigerung der Phosphorylierungs-Geschwindigkeit bewirken, wie es bei Allen u. Mitarb. offenbar der Fall ist. Wir bekamen allerdings gerade nach dem nochmaligen Waschen im hypotonischen Medium einen besonders starken Abfall der Phosphorylierungs-Geschwindigkeit (Tabelle 1). Wir konnten also den Befund von Avron, Jagendorf und Evans (1957), daß jedes Waschen die Aktivität der Chloroplasten herabsetzt, bestätigen. Offensichtlich wirken hier also 2 Faktoren gegeneinander: Die Vergrößerung der Oberfläche fördert die Phosphorylierung, während das Herauswaschen eines Cofaktors sie herabsetzt.

Die Versuche mit verschiedenen Nucleotiden als Substraten sollten klären, ob die Phosphorylierungs-Reaktion in bezug auf das Adenylsäuresystem spezifisch ist. Die Ergebnisse waren eindeutig: Soweit es sich bei den Nucleotiden um *Purin*derivate handelt, also bei großer struktureller Ähnlichkeit zu den Adenosin-Phosphaten, sind die Diphosphate durch die Chloroplasten phosphorylierbar, wenn auch die Reaktionsgeschwindigkeiten kleiner sind als bei ADP. Das strukturell stärker abweichende *Pyrimidin*derivat UDP hingegen wurde bei uns nicht phosphoryliert. Krall und Purvis (1957) teilen mit, daß ihre Chloroplasten auch Uridin- und Cytosindiphosphat phosphorylieren können, jedoch fehlen bisher nähere Angaben darüber. — Die Gleichartigkeit der Reaktionen folgt auch daraus, daß die p_H-Abhängigkeit z. B. bei IDP dieselbe ist wie sie Avron, Jagendorf und Evans (1957) und Allen, Whatley und Arnon (1958) bei ADP gefunden haben. — IMP und GMP können auch bei Zusatz geringer Mengen der zugehörigen Triphosphate nicht phosphoryliert werden; das ist ein Hinweis auf das Fehlen eines der Myokinase entsprechenden Fermentes für die beiden Nucleotide in den Chloroplasten. Daher sprechen auch diese Ergebnisse der Nichtphosphorylierbarkeit von IMP und GMP für die Annahme (Krall und Purvis 1957), daß AMP nicht direkt, sondern nur über die durch Myokinase katalysierte Umsetzung mit ATP zu ADP phosphoryliert wird.

Zusammenfassung

1. Nur bei ganzen, unzerstörten Chloroplasten, die aus *Spinat* gewonnen sind, ließ sich eine Photosynthese-Phosphorylierung nachweisen. Mit Chloroplasten aus anderen Pflanzen wurde keine Phosphorylierungs-Reaktion gefunden, auch nicht, wenn Spinat-Chloroplasten-Extrakt zugegeben wurde.

2. Extrakte von Spinat-Chloroplasten hemmen die Photosynthese-Phosphorylierung ganzer Chloroplasten.

3. Unter optimalen Bedingungen betrug die Geschwindigkeit der Phosphorylierungs-Reaktion maximal 69 μMole P/mg Chlorophyll/Std. Diese Phosphorylierungsrate wird im Vergleich mit den von anderen Autoren mitgeteilten Werten diskutiert.

4. Aus den gefundenen Konzentrationswerten der markierten Nucleotide in den Chloroplasten und in der Außenlösung wird geschlossen, daß die gebildeten Nucleotide in den Chloroplasten nicht akkumulieren, sondern sofort in die Außenlösung diffundieren.

5. Außer AMP und ADP werden auch IDP und GDP phosphoryliert, nicht dagegen die Monophosphate (IMP und GMP) und die Pyrimidinderivate (UMP und UDP).

Diese Untersuchungen wurden von der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* ermöglicht, der wir hierfür sehr zu Dank verpflichtet sind. Fräulein Ilse Ellmers danken wir für vorbildliche technische Assistenz.

Literatur

Allen, M.B., F.R. Whatley and D.I. Arnon: Photosynthesis by isolated chloroplasts. VI. Rates of conversion of light into chemical energy in photosynthetic phosphorylation. Biochim. biophys. Acta **27**, 16—23 (1958). — Arnon, D.I.: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol. **24**, 1—15 (1949). — Arnon, D.I., M.B. Allen and F.R. Whatley: Photosynthesis by isolated chloroplasts. Nature (Lond.) **174**, 394 (1954). — Photosynthesis by isolated chloroplasts. IV. General concept and comparison of three photochemical reactions. Biochim. biophys. Acta **20**, 449—461 (1956). — Arnon, D.I., F.R. Whatley and M.B. Allen: Photosynthesis by isolated chloroplasts. II. Photosynthetic phosphorylation, the conversion of light into phosphate bond energy. J. Amer. chem. Soc. **76**, 6324—6329 (1954). — Avron, M., and A.T. Jagendorf: An extractable factor in photosynthetic phosphorylation. Nature (Lond.) **179**, 428—429 (1957). — Avron, M., A.T. Jagendorf and M. Evans: Photosynthetic phosphorylation in a partially purified system. Biochim. biophys. Acta **26**, 262—269 (1957). — Chow, C.T., and B. Vennesland: Photosynthetic phosphorylation by chloroplast fragments. Plant Physiol. **32**, Suppl., S. IV (1957). — Füchtbauer, W., u. W. Simonis: Über die Wirkung von Ascorbinsäure auf die Photosynthese-Phosphorylierung durch isolierte Spinat-Chloroplasten. Naturwiss. **45**, 519—520 (1958). — Grube, K.H.: Über den Zusammenhang von Phosphathaushalt und Photosynthese bei *Helodea densa*. Planta (Berl.) **42**, 279—303 (1953). — Hill, R.: Oxidoreduction in chloroplasts. Advanc. Enzymol. **12**, 1 (1951). — Jagendorf, A.T., and M. Avron: Cofactors and rates of photosynthetic phosphorylation by spinach chloroplasts. J. biol. Chem. **231**, 277—290 (1958). — Krall, A.R., and M.R. Purvis: Nucleotid specificity of phosphorylation by isolated spinach chloroplasts. Plant Physiol. **32**, Suppl., S. IV (1957). — Mackinney, G.: Absorption of light by chlorophyll solutions. J. biol. Chem. **140**, 315—322 (1941). — Ohmura, T.: Oxidative and photosynthetic phosphorylation by chloroplast fragments. Nature (Lond.) **176**, 467—468 (1955). — Ruge, O.: Die lichtphysiologischen Grundlagen der Pflanzenbeleuchtung. Angew. Bot. **32**, 207—220 (1958). — Schwinck, L.: Nachweis von Adenosintriphosphorsäure (ATP) in Grünalgen und *Helodea* sowie Einbau von radioaktivem Phosphor (^{32}P) bei der Photosynthese. Planta (Berl.) **47**, 165—218

(1956). — Simonis, W.: Untersuchungen zur lichtabhängigen Phosphorylierung. II. Z. Naturforsch. **11b**, 354—363 (1956). — Simonis, W., u. M. Ehrenberg: Dass. IV. Die Wirkung des Lichtes auf die ^{32}P-Einlagerung bei chlorophyllfreien Pflanzenzellen und -geweben. Z. Naturforsch. **12b**, 156—163 (1957). — Simonis, W., u. K.H. Grube: Weitere Untersuchungen über Phosphathaushalt und Photosynthese. Z. Naturforsch. **8b**, 312—317 (1953). — Simonis, W., u. H. Kating: Untersuchungen zur lichtabhängigen Phosphorylierung. III. Die CO_2-Abhängigkeit der ^{32}P-Einlagerung in Ankistrodesmus. Z. Naturforsch. **11b**, 704—708 (1956). — Simonis, W., H. Kating u. G. Kues: Dass. V. Methodische Fragen zur Extraktion und Papierchromatographie von ^{32}P-markierten Verbindungen aus Algen. Z. Naturforsch. **12b**, 812—813 (1957). — Simonis, W., u. E. Quensell: Zur Wirkung von Monojodessigsäure auf die lichtabhängige Phosphorylierung (^{32}P-Einlagerung) bei *Helodea crispa*. Naturwiss. **43**, 204—205 (1956). — Simonis, W., u. G. Weichart: Untersuchungen zur lichtabhängigen Phosphorylierung. VII. Die Wirkung von Monojodessigsäure auf die Bildung von ^{32}P-markierten phosphorylierten Verbindungen in *Helodea densa* (Phosphorglycerinsäure — ein Zwischenprodukt der Photosynthese?). Z. Naturforsch. **13b**, 694—696 (1958). — Stocking, C.R.: Chloroplast isolation in nonaqueous media. Plant Physiol. **34**, 56—61 (1959). — Warburg, O.: Über den Einfluß der Wellenlänge auf die Chinonreduktion in grünen Grana. Z. Naturforsch. **7b**, 443—446 (1952). — Hill-Reaktionen. Z. Naturforsch. **13b**, 509—514 (1958). — Weichart, G.: Untersuchungen über Phosphorylierungsprozesse bei der CO_2-Assimilation höherer Pflanzen *(Helodea)* unter Verwendung von radioaktivem Phosphat. Diss. Technische Hochschule Hannover 1958. — Wessels, J.S.C.: Studies on photosynthetic phosphorylation. I. Photosynthetic phosphorylation under anaerobic conditions. Biochim. biophys. Acta **25**, 97—100 (1957). — Dass. II. Photosynthetic phosphorylation under aerobic conditions. Biochim. biophys. Acta **29**, 113—123 (1958). — Whatley, F.R., M.B. Allen, L.L. Rosenberg, J.B. Capindale and D.I. Arnon: Photosynthesis by isolated chloroplasts. V. Phosphorylation and carbon dioxide fixation by broken chloroplasts. Biochim. biophys. Acta **20**, 462—468 (1956). — Whatley, F.R., M.B. Allen, A.U. Trebst and D.I. Arnon: Photosynthesis by isolated Chloroplasts from different plants. Plant Physiol. 33, Suppl. XXVII—XXVIII (1958).

Professor Dr. W. Simonis,
Botanisches Institut der Universität, Würzburg, Klinikstraße 5

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Für die Rechtschreibung ist die „Wissenschaftliche Rechtschreibung nach JANSEN" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt. Wenn nötig, wird die Angleichung durch die Herausgeber bzw. durch die Druckerei vorgenommen.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photographien. Einzelfiguren einer Abbildung sind, falls es sich um Vorlagen für Strichätzungen handelt, wenn möglich so zusammenzustellen, daß sie in *einem* Klischee bei gleicher Verkleinerung reproduziert werden können. Buchstaben u.a. sind mit Bleistift beizufügen.

Die Texte zu den Abbildungen sind auf eigenem Blatt gesammelt beizugeben.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse (höchstens 1 Seite) anzufügen, die in Deutsch oder Englisch oder Französisch abgefaßt sein kann.

Zu den Literaturverzeichnissen: Bei Zeitschriftenartikeln sollen der Titel sowie erste und letzte Seite angegeben werden. In den Titeln von Büchern aller Sprachen sollen, zur Kennzeichnung gegenüber Artikeln in Zeitschriften, Substantiva wie Adjektiva groß, dagegen in den Abkürzungen von Zeitschriftentiteln die Substantiva groß und die Adjektiva klein geschrieben werden (z. B. Cell Res., aber cell. Physiol.).

Ergebnisse der Mikrobiologie, Immunitätsforschung und experimentellen Therapie

Herausgegeben von W. KIKUTH, Düsseldorf, K. F. MEYER, San Francisco, E. G. NAUCK, Hamburg, A. M. PAPPENHEIMER jr., Cambridge/Mass., J. TOMCSIK, Basel.

Zweiunddreißigster Band: Mit 26 Abbildungen. IV, 424 Seiten Gr.-8°. 1959.

DM 88.—

Inhaltsübersicht: On the Mechanism Underlying Initiation of Influenza Virus Infection. By A. Gottschalk, Melbourne, Australia · Das kulturell-biochemische und serologische Verhalten der Cryptococcus-Gruppe. Von H. P. R. Seeliger, Bonn · Ätiologie und Epidemiologie der Rickettsiosen des Menschen. Von F. Weyer, Hamburg · Zur Epidemiologie der Salmonelleninfektion. Von W. Fromme, Witten a. d. Ruhr · Pasteurella pseudotuberculosis unter besonderer Berücksichtigung ihrer humanmedizinischen Bedeutung. Von W. Knapp, Tübingen · L'immunisation active contre le tétanos. Par R.-H. Regamey, Berne, Suisse · Namen- und Sachverzeichnis.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden

Von Dr. LUDWIG REIMER, Dozent für Physik an der Universität Münster i.W.

Mit 135 Abbildungen und 20 Bildtafeln. VIII, 300 Seiten Gr.-8°. 1959.

Ganzleinen DM 58.—

INHALTSÜBERSICHT

A. Untersuchungsmethoden. Elektronenoptische Grundlagen des Durchstrahlungsmikroskopes. Andere Abbildungsverfahren. Messung wichtiger optischer Konstanten. Stereoabbildungen. Entstehung des Bildkontrastes. Elektronenbeugung. Scheinstrukturen durch Interferenzeffekte. Präparatveränderungen unter Elektronenbeschuß. Bildaufzeichnung und Intensitätsmessungen.

B. Präparationsmethoden. Objektblenden und Trägernetze. Herstellung und Eigenschaften von Trägerfolien. Grundlagen der Hochvakuum- und Aufdampftechnik. Oberflächenabdrücke. Schrägbeschattung. Zielpräparation. Herstellung durchstrahlbarer Metallfolien. Anorganische disperse Systeme. Organische disperse Systeme. Fixierung und Kontrastierung. Gefriertrocknung. Entwässerung und Einbettung. Ultramikrotomie. — Bezugsquellen für apparative und präparative Hilfsmittel. Bildanhang. Sachverzeichnis.

AUS DEM VORWORT

Das Buch soll eine allgemeine Einführung in die wichtigsten Präparationsverfahren geben. Dabei wird auch vor allem das Artefaktproblem an zahlreichen Beispielen diskutiert. Artefakte sind am besten zu vermeiden, wenn man mehrere voneinander unabhängige Methoden anwendet. Das Buch möchte daher auch Anregungen in dieser Richtung vermitteln. In diesem Zusammenhang sei auch bemerkt, daß man die Elektronenmikroskopie nicht als Selbstzweck betreiben, sondern als ein Hilfsmittel der Forschung unter vielen anderen anwenden sollte. Allgemein ist die Literaturauswahl so getroffen, daß sie als Ausgangspunkt für ein weiteres Literaturstudium dienen kann.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany